

Die Surfactantkonversion als enzymatischer Prozeß

**- Ist das Surfactantprotein SP-B ein Substrat der
Konvertase? -**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ariane Bagheri
aus Meppen

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Andreas Günther

Gutachter: Prof. Dr. Ewald Beck

Tag der Disputation: 03.04.2006

Inhalt

Seite

1.	Einführung	1
1.1.	Der pulmonale Surfactant	1
1.2.	Geschichtliche Entwicklung der Surfactantanalytik	1
1.3.	Morphologie des Alveolären Kompartments	3
1.4.	Surfactantmetabolismus	5
1.5.	Biochemische Zusammensetzung des Surfactant	6
1.5.1.	Lipide	6
1.5.2.	Proteine	9
1.6.	Funktionelle Eigenschaften des pulmonalen Surfactant	15
1.6.1.	Reduktion der Oberflächenspannung	15
1.6.2.	Bedeutung für den Gasaustausch	17
1.6.3.	Antiödematöser Effekt	18
1.6.4.	Schutzfunktion und Immunkompetenz des Surfactantsystems	18
1.7.	Pathophysiologie des Surfactant-Systems	19
1.7.1.	Erkrankungsbilder mit Veränderungen des Surfactantsystems	19
1.7.2.	Pathophysiologische Aspekte des Surfactantmetabolismus	21
2.	Fragestellung	24
3.	Materialien und Methoden	26
3.1.	Materialien	26
3.1.1.	Geräte	26
3.1.2.	Chemikalien	27
3.2.	Allgemeine Methoden	28
3.2.1.	Gewinnen von Surfactant aus Kaninchenlungen	28
3.2.2.	"In vitro Konversion"	28
3.2.3.	Isolierung von large surfactant aggregates	29
3.2.4.	Extraktion der hydrophoben Surfactantkomponenten	29
3.2.5.	Quantifizierung der Gesamtphospholipide mittels colorimetrischer Phosphatbestimmung	31
3.2.6.	Isolation der Surfactantproteine aus Lavage	31
3.2.6.1.	SP-A-Präparation mit Mannose-Affinitätschromatographie	32
3.2.6.2.	SP-A-Präparation mittels Anionenaustauschchromatographie	33
3.2.6.3.	Präparation von SP-B und SP-C mit LH-60-Chromatographie	34
3.2.6.4.	Separation von SP-B, Spaltprodukten, Phospholipiden und SP-C mittels rpHPLC	35
3.2.7.	Proteinbestimmungen	36
3.2.7.1.	Proteinbestimmung nach Lowry	36
3.2.7.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	37
3.2.8.	Gelelektrophoresen und Western Blots	38
3.2.8.1.	Gelelektrophorese	38
3.2.8.2.	Western Blot und N-terminale Sequenzierung	41
3.2.9.	SP-B- und SP-C-ELISA	43
3.2.10.	Esteraseaktivitätsassay	45

3.3.	Spezielle Arbeitsvorschriften	47
3.3.1.	In vitro Konversion von Surfactantpräparationen auf natürlicher Basis	47
3.3.2.	In vitro Konversion von synthetischen Surfactantpräparationen	48
3.3.2.1.	In vitro Konversion eines synthetischen PL-Gemisches mit variablem SP-B-Gehalt	48
3.3.2.2.	In vitro Konversion eines synthetischen PL-Gemisches mit variablem SP-C-Gehalt	49
3.3.2.3.	In vitro Konversion eines synthetischen PL-Gemisches mit variablem SP-A-Gehalt	49
3.3.3.	In vitro Konversion von Kaninchen-SP-B Dimer mit Schweineleberesterase	50
3.3.3.1.	In vitro Konversion von SP-B mit Schweineleberesterase und Bligh & Dyer-Trennung	51
3.3.3.2.	In vitro Konversion von SP-B mit Esterase und Reduktion mit DTT	51
3.3.3.3.	Kopplung von Schweineleberesterase an Sepharose und In vitro Konversion von SP-B mit Sepharose-Esterase	51
3.3.3.4.	In vitro Konversion von SP-B mit kommerziellen Esterase-Acrylbeads	53
3.3.3.5.	In vitro Konversion von SP-B für die Sequenzierung aus dem Western Blot	54
3.3.4.	Schütteln von SP-B mit Sepharose-Esterase, HPLC und SDS-PAGE	55
3.4.	Statistik	56
4.	Ergebnisse	57
4.1.	Einfluß von Esteraseaktivität auf die Konversion	57
4.1.1.	Einfluß von Schweineleberesterase auf die Konversion von Surfactantpräparationen auf natürlicher Basis	57
4.1.2.	Einfluß des Gehalts an Apoproteinen in synthetischen Surfactantpräparationen auf die Konversion	58
4.2.	Nachweis von Esteraseaktivität in nativer BAL und in aus Lavage isolierten Zellen	61
4.2.1.	Vergleich der Esteraseaktivität in verschiedenen BAL-Pools	61
4.2.2.	Nachweis von Esteraseaktivität in Alveolarmakrophagen und Zelllysaten	62
4.3.	Umsetzung von isoliertem SP-B mit Schweineleberesterase, Isolierung des Spaltproduktes und Sequenzierung	64
4.3.1.	In vitro Konversion von SP-B mit Schweineleberesterase	64
4.3.2.	Organische Extraktion der Reaktionsansätze	65
4.3.3.	In vitro Konversion von SP-B mit Sepharose-Esterase bzw. Esterase-Acrylbeads	67
4.3.4.	In vitro Konversion von SP-B mit Esterase und Reduktion mit DTT	68
4.3.5.	N-terminale Sequenzierung des Spaltproduktes	70
4.4.	HPLC-Läufe von Reaktionsansätzen von SP-B mit Sepharose-Esterase	73
4.4.1.	rp-HPLC mit einer C ₈ -Säule, 100Å	73
4.4.2.	In vitro Konversion von LSA mit anschließender HPLC und SDS-PAGE	76

5.	Diskussion	79
6.	Zusammenfassung	86
7.	Literatur	88
8.	Abkürzungen	115

1. Einführung

1.1. Der pulmonale Surfactant

Die Alveolen der Lunge sind mit einem dünnen Film ausgekleidet, der ein komplexes Gemisch von Phospholipiden (PL, 90-95%), Proteinen (5-10%) und Carbohydraten [1,2] darstellt. Die herausragendste Funktion dieses Films ist die Reduktion der Oberflächenspannung durch Adsorption an die Luft-Wasser-Grenzfläche. Diese Eigenschaft des PL-Films prägte die Bezeichnung **surface active agent**, kurz Surfactant. Erst die Anwesenheit dieses früher auch als Antiatelektasefaktor bezeichneten Surfactant ermöglicht eine physiologische Atmung bei normalem transthorakalen Druckgradienten, indem er die Alveolen stabilisiert und einen endexpiratorischen Kollaps der Lungenbläschen verhindert.

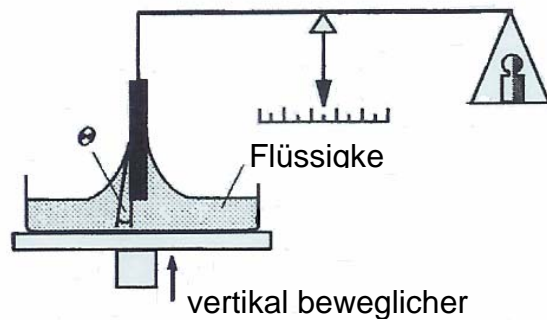
Die biophysikalische Aktivität des Surfactant wird im Wesentlichen durch dessen Phospholipidbestandteil gewährleistet. Die surfactantspezifischen Proteine sind für die Ausbreitung und Stabilität des Phospholipidfilms während der Atembewegungen, wobei der Monolayer periodisch gedehnt und gestaucht wird, von Bedeutung. Außerdem erfüllen die Proteine wichtige Funktionen im Surfactantmetabolismus und bei der Immunmodulation. Die vier bisher beschriebenen surfactantspezifischen Proteine werden nach einem Nomenklaturvorschlag von Possmayer [3] als SP-A, SP-B, SP-C und SP-D bezeichnet.

1.2. Geschichtliche Entwicklung der Surfactantanalytik

Das Phänomen der reduzierten Oberflächenspannung durch die Anwesenheit spezifischer Komponenten in der Lunge wurde erstmals 1929 von Kurt von Neergaard [4] beschrieben. Seine Experimente an isolierten Tierlungen zeigten, daß die alveoläre Oberflächenspannung den wichtigsten Faktor für die Retraktionskraft der Lunge darstellt. Die Proportionalität des Drucks zu Oberflächenspannung und Alveolendurchmesser wird dabei näherungsweise durch das Gesetz von Laplace ($\Delta p = 2\gamma / r$) [5] wiedergegeben. Die Isolation der oberflächenaktiven Bestandteile und die genauere Untersuchung ihrer biophysikalischen Wirkungsweise begann jedoch erst 25 Jahre später mit der Entwicklung neuer Meßmethoden wie z. B. der Wilhelmy-

Waage [6] durch Clements [7] und Pattle [8]. Diese Meßmethode basiert auf einer Kraftmessung, wobei als Meßkörper eine Platinplatte mit bekannter Geometrie dient.

Abb.1: Meßprinzip der Wilhelmy-Waage.



Die Oberflächenspannung an der Phasengrenze flüssig / gasförmig ergibt sich als Quotient aus der gemessenen Kraft und dem Produkt aus benetzter Plattenlänge und dem Benetzungswinkel θ .

Durch biochemische Analysen identifizierten Klaus et al. [9] das dipalmitoylierte Phosphatidylcholin als den mengenmäßig größten und zugleich auch biophysikalisch aktivsten Bestandteil des pulmonalen Surfactant. Als zweithäufigste Lipidkomponente wurde Phosphatidylglycerol gefunden, welches in den übrigen tierischen Geweben jedoch kaum nachweisbar ist.

Obgleich die oberflächenaktive Eigenschaft des Phosphatidylcholins durch in vitro-Experimente mit unterschiedlichen Phospholipidmixturen demonstriert werden konnte, zeigte die Behandlung unreifer Tierlungen mit solchen Phospholipidpräparationen nur eine unzureichende Verbesserung von Compliance und Gasaustausch. Demnach sind weitere Faktoren für eine optimale Funktion des Surfactant essentiell [10].

Die Beeinträchtigung der biophysikalischen Wirksamkeit von pulmonalem Surfactant durch Vorbehandlung mit Proteasen [8], sowie spektroskopische Daten wiesen auf das Vorliegen eines Lipoproteingemisches hin [11]. Die surfactantspezifischen Apoproteine wurden schließlich zu Beginn der siebziger Jahre von King und Clements charakterisiert [12,13].

Eine Reihe von Erkrankungen gehen mit pathologischen Veränderungen des Surfactantsystems einher, so z. B. das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS). Dieses kann auch bei zuvor

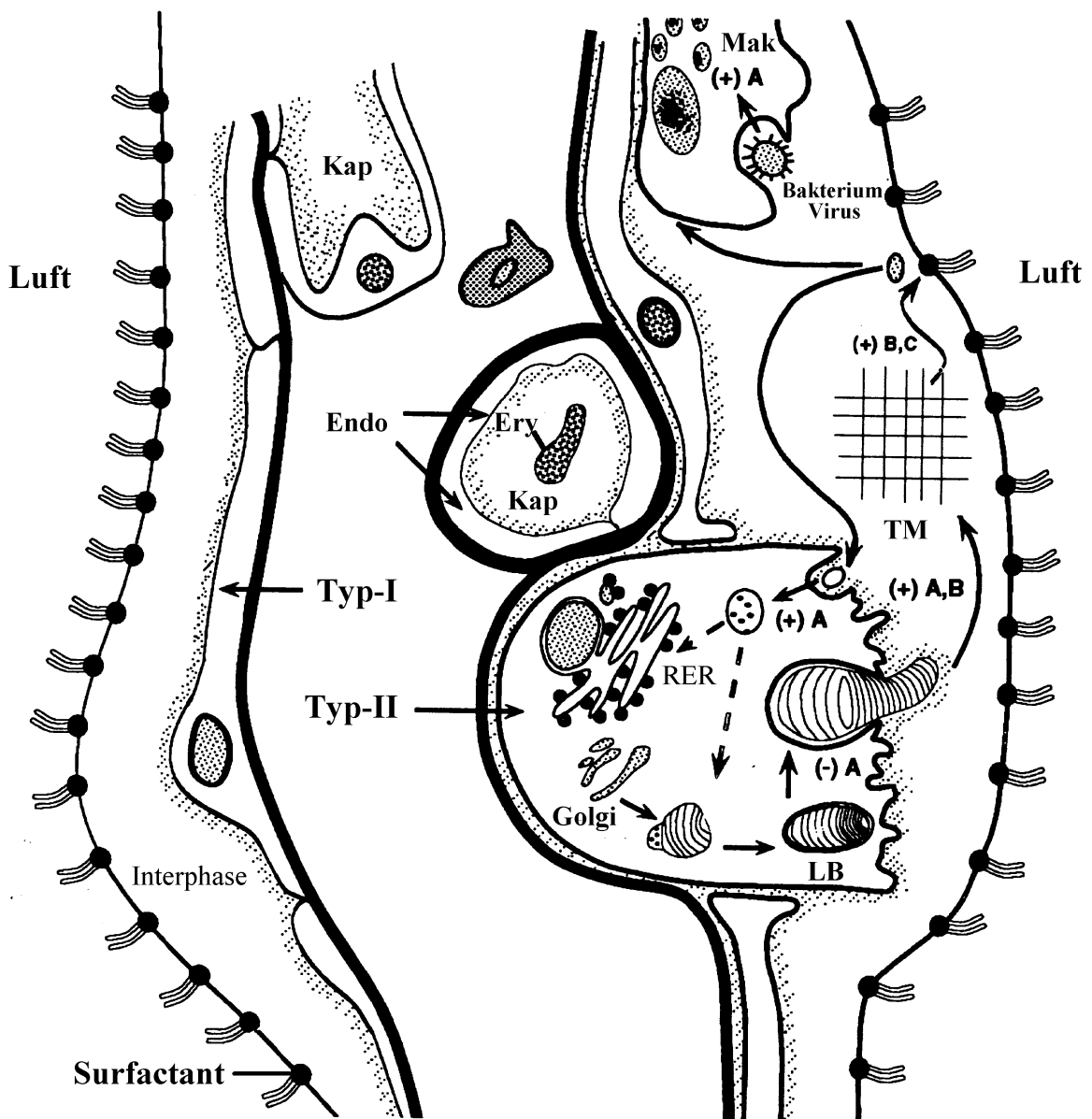
Lungengesunden als Folge beispielsweise einer Sepsis, eines Polytraumas oder einer Inhalation toxischer Rauchgase entstehen. Dem Atemnotsyndrom frühgeborener Säuglinge (Infant Respiratory Distress Syndrome, IRDS) liegt hingegen eine unzureichende Surfactantproduktion in der noch unreifen Lunge zugrunde. Davon betroffen sind Neugeborene, die vor dem 7. Monat entbunden werden, da erst ab diesem Zeitpunkt eine ausreichende Synthese von Surfactant in der Lunge beginnt. Ist eine Geburt des Kindes deutlich vor dem Termin geplant oder zu befürchten, kann durch die intravenöse Gabe von Kortikosteroiden mütterlicherseits die fetale Surfactantproduktion stimuliert und so die Lungenreifung gefördert werden [14, 15, 16].

1.3. Morphologie des alveolären Kompartments

Das Alveolarepithel wird von den Alveolarzellen Typ I und Typ II gebildet. Die langgestreckten flachen Alveolarzellen Typ I sind von der umgebenden kapillären Blutbahn, außer von den Basalmembranen, nur durch ein äußerst schmales Interstitium getrennt. Dadurch entsteht eine minimale Diffusionsstrecke für den Gasaustausch. Die Alveolarzellen Typ I kleiden 90% der alveolären Oberfläche aus, sind zahlenmäßig jedoch den kubischen Alveolarzellen Typ II unterlegen [17, 18]. Das Alveolarepithel besitzt die Fähigkeit zur Regeneration, insbesondere die Typ II-Zellen werden durch Dehnung nicht nur zur vermehrten Produktion von Surfactant, sondern auch zur Umdifferenzierung in Typ I-Zellen stimuliert [19, 20, 21, 22]. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass möglicherweise auch eine Umdifferenzierung von Typ I-Zellen in Typ II-Zellen stattfinden kann [23].

Die alveolären Typ II Zellen sind für die Neusynthese und das Recycling des pulmonalen Surfactant zuständig und enthalten elektronenmikroskopisch darstellbare osmiophile lamelläre Körperchen, die sogenannten lamellar bodies, die als Speicherform des Surfactant anzusehen sind.

Abb. 2: Schema des alveolären Kompartments.



Pulmonaler Surfactant wird im rauen endoplasmatischen Retikulum (**RER**) der **Typ II-Zellen** gebildet und über den Golgi-Apparat zu den Lamellarkörperchen (**LB**) transportiert. Anschließend erfolgt die Exozytose in die alveoläre Interphase und die Umwandlung in tubuläres Myelin (**TM**), dem Vorläufer des oberflächenaktiven Phospholipid-Monolayers. Die Surfactantproteine wirken bei diesen Transport- und Umwandlungsprozessen mit **(+/- A, B, C)**. **MAK**: Alveolarmakrophage; **Endo**: Endothelzelle; **Kap**: Kapillare; **Ery**: Erythrozyt.

Von der Synthese im endoplasmatischen Retikulum der Zelle bis zum fertigen PL-Monolayer durchlaufen die Surfactantkomponenten eine Reihe von Veränderungen und Umformungen, die durch die Interaktionen zwischen Lipiden und Apoproteinen charakterisiert sind [24, 25, 26, 27, 28, 29]. Wie biochemische und autoradiographische Untersuchungen gezeigt haben, erfolgt der Transport der Lipide vom endoplasmatischen Retikulum durch den Golgi-Apparat über kleinere Vesikel zu den Lamellarkörperchen [30, 31]. Diese beinhalten neben den als dicht gepackte Bilayer vorliegenden PL [32] auch die surfactantspezifischen Proteine SP-A, SP-B und SP-C. Nach Sekretion des Surfactant in die Hypophase des Alveolarraumes werden die Lamellarkörperchen in tubuläres Myelin umgewandelt [32, 33], welches eine dreidimensionale gitterartige Struktur mit hoher Ordnung besitzt. Es ist der Vorläufer des als Monolayer vorliegenden fertigen Surfactantfilms, von welchem es sich nur geringfügig in der Lipidzusammensetzung unterscheidet [31]. Für diese Umwandlung sind die Apoproteine SP-A und SP-B, sowie hohe Ca^{2+} -Konzentrationen von großer Bedeutung [34]. Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass das SP-A hierbei an oder zumindest in der Nähe der Kreuzungsstellen der Lipidbilayer des tubulären Myelins zu finden ist [35].

Die Lamellarkörperchen und das tubuläre Myelin repräsentieren die biophysikalisch hochaktive Form des pulmonalen Surfactant. Durch Ultrazentrifugation lassen sich diese sogenannten large surfactant aggregates (LSA, ca. 80%) von leichteren Bestandteilen, den sogenannten small surfactant aggregates (SSA, ca. 20%) abtrennen. Die SSA zeigen eine deutlich geringere biophysikalische Aktivität und stellen offensichtlich Abbauprodukte der LSA dar [36, 37, 38, 39]. Dieser Umwandlungsprozess der LSA zu den SSA wird als Surfactantkonversion bezeichnet.

1.4. Surfactantmetabolismus

Der gesamte Pool des intraalveolären Surfactant unterliegt in seinen einzelnen Komponenten einem kontinuierlichen Kreislauf von Synthese, Sekretion, Zerfall, Wiederaufnahme, vor allem durch Typ II Zellen, und Recycling [40, 41, 42, 43, 44, 45]. In geringerem Maße werden die Surfactantbestandteile auch von Makrophagen

phagozytiert [46, 47, 48]. Ein solcher metabolischer Zyklus (turnover) dauert im Falle der Lipide etwa 10 h [49, 50].

Während der Durchwanderung der metabolischen Sequenz von LSA in SSA verändert sich die Konstitution der Phospholipid-Apoprotein-Aggregate. Dieser als Surfactantkonversion bezeichnete Prozess wird hochwahrscheinlich durch eine Carboxylesterase vermittelt, die dementsprechend als Konvertase bezeichnet wird.

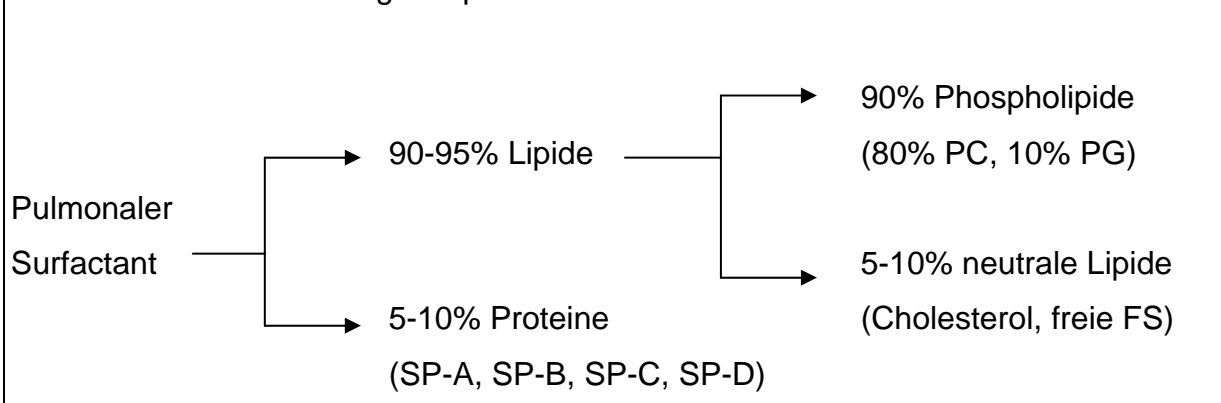
In Ruhe werden pro Stunde ca. 10 % des dipalmitoylierten Phosphatidylcholins (DPPC) sämtlicher Lamellarkörperchen in den Alveolarraum sezerniert [51]. Eine Steigerung der Sekretionsrate kann durch pharmakologische Stimulanzien, unter anderem Cholinergika [52], Prostaglandine und Leukotriene [53, 54], sowie durch Adenosinnukleotide [55, 56] und β -Sympathomimetika [57] erfolgen. Ebenso wird die Sekretion von Surfactant durch die Dehnung der Typ II Alveolarzellen bei tiefer Inspiration (stretch) [58, 59, 60] gefördert. Im Gegensatz dazu wird die Surfactantsekretion durch erhöhte SP-A-Konzentrationen eher gehemmt [24, 61, 62]. Ebenso wie Glucokortikoide induzieren das Schilddrüsenhormon Thyroxin [63, 64], sowie die Hypophysenhormone ACTH [65, 66] und TSH [67, 68] eine vermehrte Synthese von Surfactant.

1.5. Biochemische Zusammensetzung des Surfactant

1.5.1. Lipide

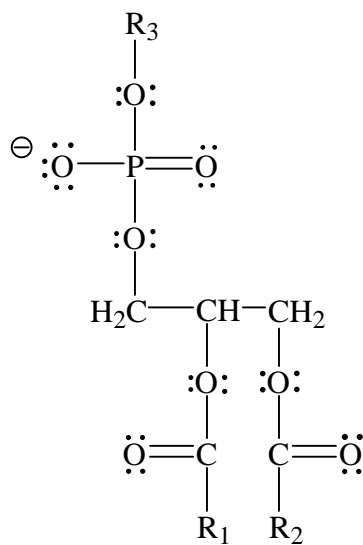
Mit einem Anteil von mehr als 90% machen die Lipide den größten Anteil der Komponenten des pulmonalen Surfactant aus [51,69,70].

Abb. 3: Zusammensetzung des pulmonalen Surfactant

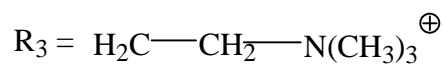


Dieser wiederum setzt sich zu 80% aus mit ungesättigten Fettsäuren, wie z. B. Palmitin- und in geringerem Maße Stearinsäure, verestertem Phosphatidylcholin (PC = Lecithin) zusammen. 5-10% des Lipidbestandteils entfallen jeweils auf Phosphatidylglycerol (PG), das zumeist mit Ölsäure verestert vorliegt, und auf neutrale Lipide wie Cholesterol und freie Fettsäuren (FS).

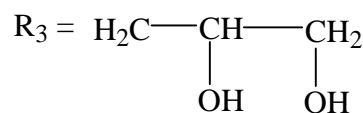
Abb. 4: Struktur der Phospholipide.



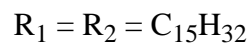
Phosphatidylcholin:



Phosphatidylglycerol:



Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC):



Weitere Phospholipidklassen wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin und Sphingomyelin [70,71,72] stellen bis zu 2% der Phospholipide. Über die funktionelle Bedeutung dieser sogenannten Minorkomponenten ist bisher wenig bekannt.

Funktionelle Bedeutung der Lipide

Charakteristisch für die Lipidzusammensetzung von pulmonalem Surfactant ist der hohe Anteil an dipalmitoyliertem Phosphatidylcholin (DPPC). Als Membranbestandteil ist PC ansonsten üblicherweise in Position 2 mit einer ungesättigten Fettsäure verestert. Im Surfactant finden sich dagegen nur geringe Anteile an Palmitoyl-Oleoyl-(16:0/18:1)-, Palmitoyl-Palmitoleoyl-(16:0/16:1)- und Palmitoyl-Linoleoyl-(16:0/18:2)-PC [73, 74].

Die ausgeprägte Oberflächenaktivität des DPPC erklärt sich durch seine relativ hohe Phasenübergangstemperatur von 41°C und die Linearität der beiden Palmitatreste. Innerhalb des die Alveolen auskleidenden Phospholipidmonolayers ragen die polaren Phosphatgruppen in die wässrige Hypophase, die der Alveolenwand zugekehrt ist. Die hydrophoben Fettsäurereste erstrecken sich lumenwärts in die Gasphase.

Selbst bei ausgeprägter lateraler Kompression eines solchen DPPC-Filmes wird so ein Austritt von DPPC in die Hypophase verhindert. Dies ist eine Grundvoraussetzung für das Erreichen niedriger Oberflächenspannungswerte.

Darüber hinaus erleichtern die ungesättigten molekularen Spezies aufgrund ihrer geringeren Phasenübergangstemperatur möglicherweise die Adsorption und Ausbreitung des Surfactantfilms an der Luft-Wasser-Grenzfläche.

Unter den Säugetieren gibt es Variationen in der Phospholipidkomposition des pulmonalen Surfactant. Bei Mensch, Ratte und Rind [75, 76, 77, 78] ist PG mit einem Anteil von bis zu 10 % im Phospholipidpool des pulmonalen Surfactant enthalten. Beim Kaninchen sind es lediglich 5% [78, 79], beim Rhesusaffen sogar weniger als 1% [80]. Stattdessen findet sich dort PI, ein wie PG ebenfalls saures Lipid.

Die Bedeutung für die Oberflächenaktivität dieser beiden Phospholipide ergibt sich demnach weniger aus deren Struktur, sondern vielmehr aus dem Vorhandensein einer negativ geladenen Kopfgruppe.

Zudem steigert die Anwesenheit von PG die Ca^{2+} -abhängige Bindung von SP-A an DPPC [81, 82] und beschleunigt die Endozytose liposomaler Phospholipide in Typ II-Zellen [59, 83, 84].

Bei der Analyse der Phospholipidzusammensetzung humaner Amnionflüssigkeit zwischen der 28. und 35. Schwangerschaftswoche ist diese Umkehrung des PG/PI-Verhältnisses ebenfalls zu beobachten [85, 86]. Erst im Verlaufe der Schwangerschaft stellt sich allmählich der für die vollständig entwickelte Lunge typische PG-Gehalt ein, so dass der PG/PI-Quotient zur Beurteilung der Lungenreife herangezogen werden kann.

Bei pathologischen Veränderungen des Surfactantsystems, wie z. B. der idiopathischen Lungenfibrose [75, 77, 87] oder dem ARDS [76] kommt es ebenfalls zur Abnahme des PG/PI-Quotienten.

Wenngleich PG wie auch PC relativ viel Palmitinsäure enthält, so ist doch der Anteil an dipalmitoyliertem PG weitaus geringer [78, 88, 89, 90].

1.5.2. Proteine

Bei den surfactantspezifischen Proteinen SP-A und SP-D handelt es sich um hydrophile Glykoproteine. SP-B und SP-C sind dagegen sehr hydrophobe, vergleichsweise kleine Proteine.

Tab. 1: Apoproteine, Präkursoren und posttranslationelle Modifikationen.

Protein	Precursor [kDa]	Posttranslatorische Modifikation	Monomer [kDa]
SP-A	200-250	Signal-Peptid-Abspaltung Glycosylierung Prolin-Hydroxylierung Sulfonierung Acetylierung Oligomerisierung Sialinierung	28-36
SP-B	42	Signal-Peptid-Abspaltung Glycosylierung Proteolytische Spaltung	9
SP-C	21	Proteolytische Spaltung Acylierung	4-6
SP-D	39,3	Glycosylierung Prolin-Hydroxylierung	43

SP-A

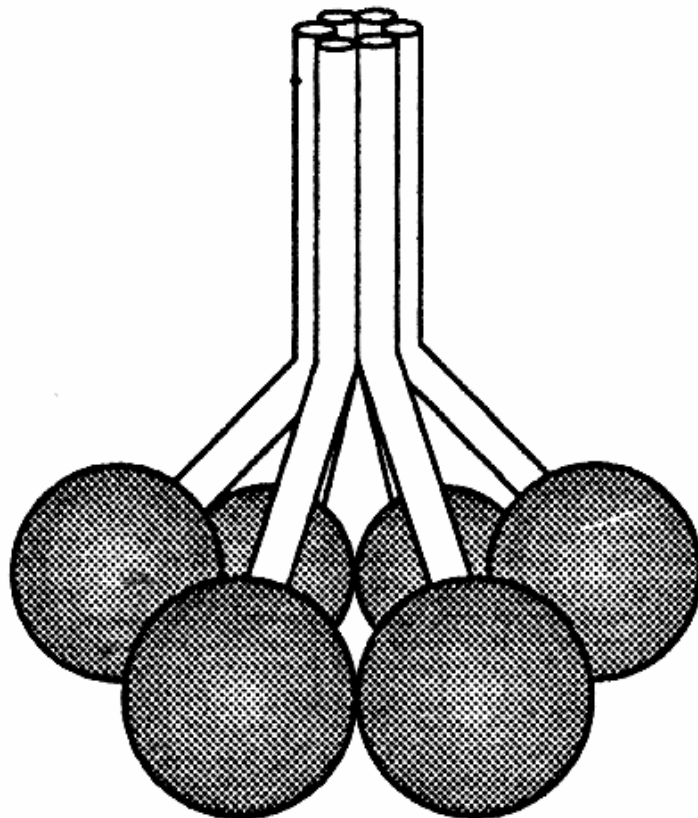
Humanes SP-A wird in den alveolären Typ II Zellen, sowie in den Clara-Zellen synthetisiert [91, 92] und dort von zwei verschiedenen Genen kodiert [93, 94, 95], die beide auf dem Chromosom 10 lokalisiert sind [93, 96]. Das primäre Translationsprodukt besteht aus 248 Aminosäuren [97] und besitzt eine relative Molmasse von 200-250 kDa [98]. Dieser Precursor durchläuft auf dem Weg zum endgültigen Protein eine Reihe von Modifizierungen, wie proteolytische Spaltungen [98], Glycosylierung [99], Acetylierung [95], Prolin-Hydroxylierung [100] und

Substitution mit Sialinsäureestern [99, 101]. Das vollständig prozessierte monomere SP-A besitzt in seinen Isoformen eine relative Molmasse von 28-36 kDa [99, 101, 102] und einen isoelektrischen Punkt zwischen 4.8 und 5.5 [101].

Innerhalb verschiedener Species ist die Primärstruktur von SP-A offensichtlich hochkonserviert [95, 97, 103, 104, 105].

SP-A besitzt demnach in seiner alveolär sezernierten Form eine relative Molmasse von 700 kDa. Es setzt sich aus 18 Monomeren zusammen, wobei sich sechs Trimere, wie „einzelne Tulpen zu einem Tulpenstrauß“, zu einem Hexamer vereinen [106].

Abb. 5: Struktur von SP-A.



Die Struktur eines Monomers kann in drei Bereiche gegliedert werden:

- Eine kurze aminoterminal Region bestehend aus 7-10 Aminosäuren enthält einen Cysteinrest, welcher über die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken die Oligomerisierung der Monomere untereinander ermöglicht.
- Eine kollagenartige Domäne mit Triple-Helix-Struktur [106, 107, 108], die 23-24 Gly-X-Y-Triplets enthält, wobei Y am häufigsten 4-Hydroxyprolin [100, 109] repräsentiert.
- Eine globuläre lektinähnliche Domäne, die die C-terminalen 150 Aminosäuren umfaßt [106]. Sie besitzt die Fähigkeit Ca^{2+} -abhängig Kohlenhydrate zu erkennen [110] und weist außerdem sowohl strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeiten mit C-Typ-Lektinen auf, wie z. B., mit dem Komplementfaktor C1q, dem Mannose bindenden Protein (MBP) und dem bovinen Konglutinin [111, 112, 113].

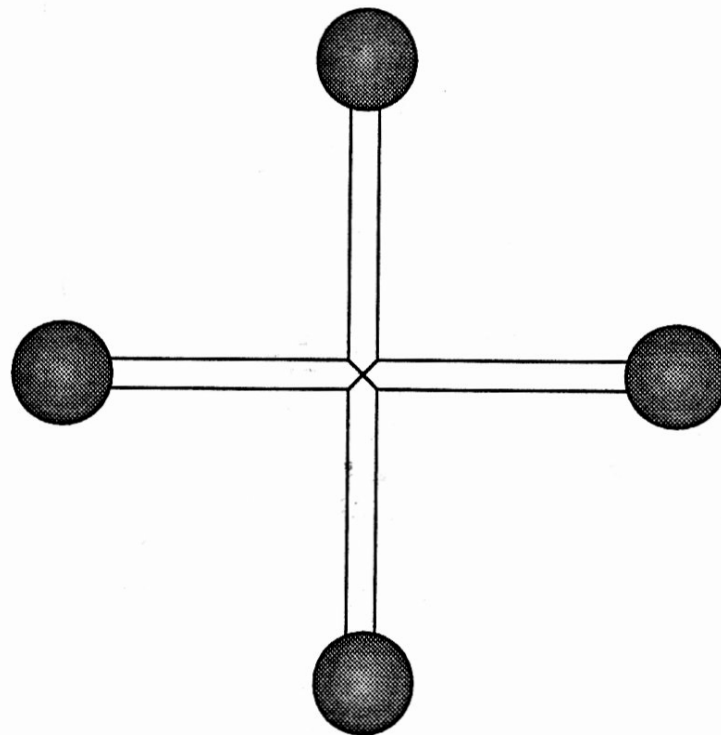
SP-D

Wie SP-A ist SP-D ein hydrophiles lektinartiges Glykoprotein, das wie alle übrigen Surfactantproteine in den Typ II-Zellen synthetisiert wird [92, 114, 115] und ebenso wie SP-A Ca^{2+} -abhängig Kohlenhydrate bindet [116, 117]. Es wird ebenso wie SP-A auch von Epithelzellen endokriner Drüsen und Mucosazellen des Gastrointestinal- und des Urogenitaltrakts exprimiert [118]. Das primäre Translationsprodukt besitzt ein Molekulargewicht von 39.3 kDa. Die Sequenz des endgültigen Proteins umfasst sowohl beim Menschen [119] als auch bei der Ratte [120] 355 Aminosäuren. Ebenso kann die Struktur des SP-D in drei Bereiche unterteilt werden:

- Ein kurzer Aminoterminus mit 25 Aminosäuren, davon zwei Cysteinreste.
- Eine kollagenartige Domäne von 177 Aminosäuren mit 59 fortlaufenden Gly-X-Y-Triplets.
- C-terminal einen hydrophilen, Kohlenhydrate erkennenden Bereich mit 153 Aminosäuren [116, 117].

Allerdings ist die Sequenzhomologie von humanem SP-D zu Konglutinin mit 66% noch größer als zu SP-A mit nur 36% [114]. SP-D wird als Trimer sezerniert, welches durch Disulfidbrücken stabilisiert wird [121]. Die funktionelle Erscheinungsform als 516 kDa schweres Dodekamer entsteht durch die Verknüpfung von vier Trimeren über Disulfidbrücken. Dies konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und mittels Proteinaseverdau gezeigt werden [122, 123].

Abb. 6: Struktur von SP-D.



SP-B

Wie SP-A wird auch SP-B in den alveolären Typ II Zellen und in den Clara-Zellen exprimiert. Das primäre Translationsprodukt ist auf dem Chromosom 2 kodiert [124, 125] und entspricht einem Proprotein mit einer Molekularmasse von 42 kDa [28, 126, 127].

Das Surfactantprotein B liegt unter physiologischen Bedingungen zu über 90% als Dimer vor [128]. Dabei sind die beiden Monomere über eine Disulfidbrücke, die von den jeweiligen Cysteinresten in Position 48 gebildet wird, miteinander verknüpft

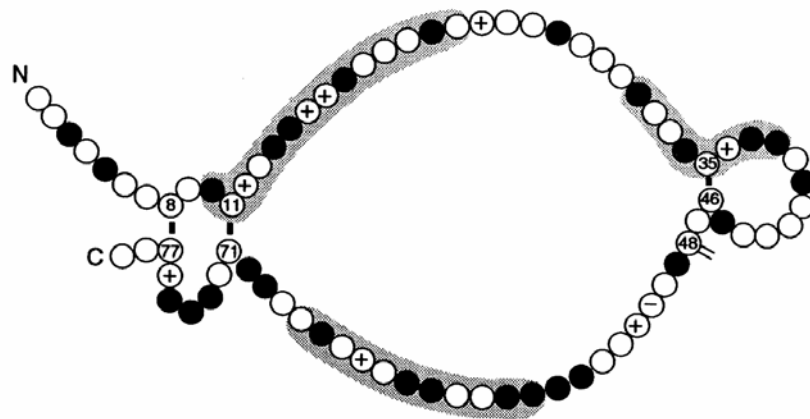
[129]. SP-B Dimer ist ein stark hydrophobes, basisches Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 19 kDa, entsprechend dem doppelten Molekulargewicht des Monomers (9 kDa). Von den 79 Aminosäuren des SP-B Monomers sind bei Schwein, Kaninchen, Ratte und auch beim Menschen sieben Cysteine [130], wovon sechs intramolekulare Disulfidbrücken (Cys-8-Cys-77; Cys-11-Cys-71; Cys-35-Cys-46) bilden. Das siebte Cystein in Position 48 bildet, wie schon erwähnt, die intermolekulare Disulfidbrücke zur Dimerisierung mit einem zweiten Monomer aus. Diese Struktur des SP-B ist zumindest für den Menschen [62] und für das Schwein belegt [131].

Abb. 7: Aminosäuresequenz von humanem SP-B.

```
1  Phe-Pro-Ile-Pro-Leu-Pro-Tyr-Cys-Trp-Ile-Cys-Arg-Ala-Leu  
  
15 Ile-Lys-Arg-Ile-Gln-Ala-Met-Ile-Pro-Lys-Gly-Ala-Leu-Ala(Ile)-Val  
  
30 Ala-Val-Ala-Gln-Val-Cys-Arg-Val-Val-Pro-Leu-Val-Ala-Gly-Gly  
  
45 Ile-Cys-Gln-Cys-Leu-Ala-Glu-Arg-Tyr-Ser-Val-Ile-Leu-Leu-Asp  
  
60 Thr-Leu-Leu-Gly-Arg-Met-Leu-Pro-Gln-Leu-Val-Cys-Arg-Leu-Val  
  
75 Leu-Arg-Cys-Ser-Met
```

Aufgrund der intramolekularen Disulfidbrücken bildet das Protein sogenannte Kringeldomänen aus, die diesem strukturelle Ähnlichkeit mit Serinproteasen, wie z. B. Plasminogen, Gewebeplasminaktivator tPA, Urokinase, Prothrombin, sowie mit Haptoglobin und Fibronectin verleiht [62, 131].

Abb. 8: Struktur von SP-B.



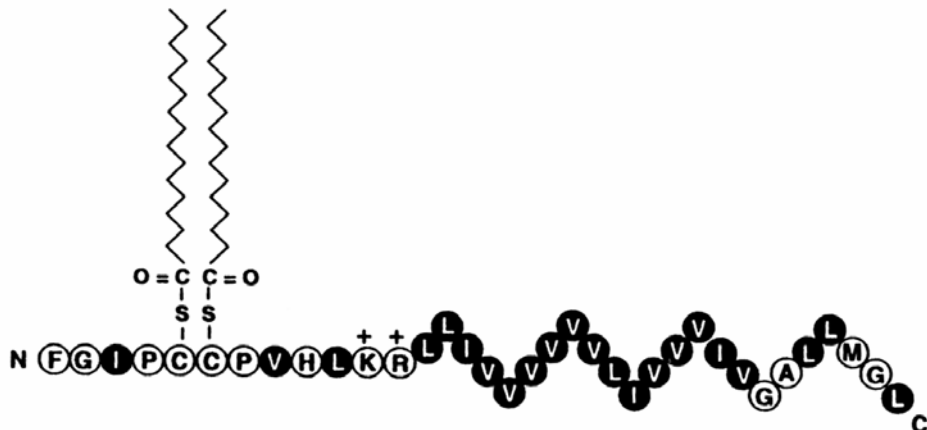
Die Precursorformen finden sich innerhalb der Zelle im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat und in Transportformen (Multivesikularkörperchen) wieder. Durch eine Reihe posttranslationaler Modifizierungen wie proteolytische Abspaltung der glycosylierten, 200 Aminosäuren umfassenden aminoterminalen und der 102 Aminosäuren umfassenden carboxyterminalen Sequenzen entsteht schließlich das aktive Protein [28, 126, 132, 133], welches innerhalb der Zelle ausschließlich in den Lamellarkörperchen [103] zu finden ist.

SP-C

Eines der hydrophobsten und kleinsten natürlichen Proteine überhaupt ist SP-C mit einer Sequenzlänge von 33-35 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 4-6 kDa [3, 130]. Carboxyterminal findet sich eine durchgehende α -helikale Anordnung von hydrophoben 23 Aminosäuren, unter anderem sechsmal aufeinanderfolgend Valin (Polyvalin). Synthetisiert wird SP-C ebenso wie SP-A und SP-B in den Typ II-Zellen [134, 135] und ist dort auf dem Chromosom 8 kodiert [136]. Eine Sequenz von 197 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 21 kDa bildet das primäre Translationsprodukt [103, 132, 136]. Dieses wird unter anderem aminoterminal über Cystein mit Palmitinsäureresten verestert.

Unter physiologischen Bedingungen liegt das in den Alveolarraum sezernierte fertig prozessierte SP-C als Monomer vor [137], für das Kaninchen ist auch eine dimere, nichtpalmitoylierte Form beschrieben [138].

Abb. 9: Struktur von SP-C.



1.6. Funktionelle Eigenschaften des pulmonalen Surfactant

1.6.1. Reduktion der Oberflächenspannung

Die amphiphilen Eigenschaften der Phospholipide, mit einer Phosphatgruppe als hydrophilem Kopfteil und den langkettigen Fettsäureestern als hydrophobem Schwanzteil, befähigen diese zur Ausbildung membranöser Strukturen in Form von Bilayern oder auch von flächigen Monolayern, z. B. als oberflächenaktive Filme entlang von Luft-Wasser-Grenzflächen. Die Eigenschaften solcher Filme werden dabei maßgeblich durch die Natur der substituierten Fettsäuren bestimmt. Bei ungesättigten Fettsäuren führt das Vorhandensein von Doppelbindungen zur Abwinkelung der Kohlenstoffkette. Daraus resultiert eine abgesenkte Phasenübergangstemperatur, was auch in einer größeren Fluidität und schlechteren Kompressibilität des Films Ausdruck findet [139]. Ungesättigte Phospholipide sind aufgrund ihrer sterischen Eigenschaften sehr mobil und können bei Kompression des Films aus dem Monolayer entweichen, was man auch als "squeeze out" bezeichnet [139, 140]. Ein optimaler Anteil von 20-30% Öl- und Linolensäure im PC

gewährleisten jedoch eine ausreichende Fluidität des Surfactantfilms und somit eine schnelle Adsorption an die Luft-Wasser-Grenzfläche ohne dabei die Stabilität des Monolayers zu gefährden.

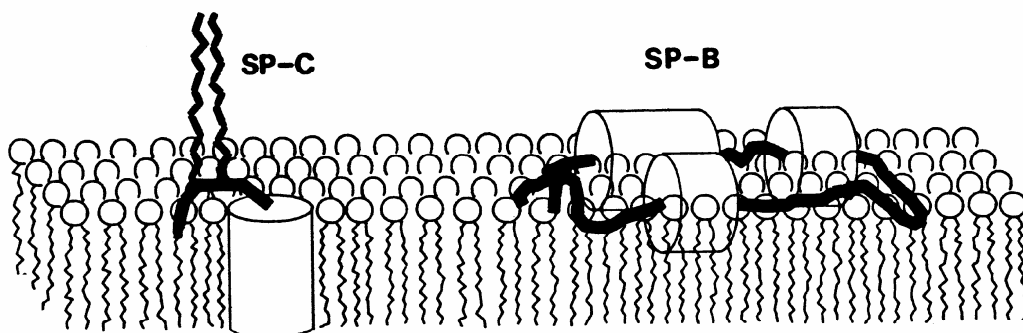
Allerdings sind reine Phospholipidpräparationen ohne die Anwesenheit der Surfactantproteine nicht in der Lage eine für physiologische Gegebenheiten ausreichende biophysikalische Aktivität zu erreichen [141, 142, 143, 144].

Die Surfactantproteine modulieren über elektrostatische Wechselwirkungen und Van der Waals-Kräfte die Funktionalität des Phospholipidfilms. Die Bedeutung dieses modulierenden Effektes wird deutlich, sobald die Funktionalität der Surfactantproteine, beispielsweise durch Zusatz von monoklonalen Antikörpern, beeinträchtigt wird. Die Depletion von SP-B aus dem Surfactant frühgeborener Kaninchen mittels Antikörpern führt dementsprechend zu einer deutlichen Verschlechterung der Oberflächenaktivität dieses Surfactant [145, 146].

SP-B stabilisiert vermutlich den Phospholipidfilm während der Kompressionsphase über elektrostatische Wechselwirkung mit anionischen Phospholipiden wie PG und PI [147, 148, 149]. Ein Verlust des Surfactant an SP-B geht demnach mit einer entsprechenden Einbuße an biophysikalischer Aktivität einher [150]. Die Ausbildung des Phospholipid-Monolayers entlang der Luft-Wasser-Grenzfläche (Adsorption) ist hierbei deutlich verlangsamt, was wiederum zu einer verzögerten Reduktion der Oberflächenspannung führt [151].

Das dipalmitoylierte SP-C dient als Anker zwischen Monolayer und wässriger Interphase und steigert so die Adsorptionsfähigkeit des Surfactant [29, 152, 153, 154].

Abb. 10: Assoziation von SP-B und SP-C mit dem Phospholipidfilm.



SP-A hat als hydrophiles Protein keinen unmittelbaren Einfluß auf die Oberflächenaktivität [28, 81, 155, 156, 157, 158]. In vivo unterstützt SP-A jedoch die hydrophoben Surfactantproteine bei der Ausbildung der Phospholipid-Apoprotein-Aggregate, wie z. B. dem tubulären Myelin. Zudem hemmt es die Sekretion der Lamellarkörperchen in den Alveolarraum. SP-A bindet spezifisch an Typ II-Zellen [26, 159, 160, 161], steigert die Wiederaufnahme von Surfactantlipiden in Typ II-Zellen [83] und den Surfactantabbau durch Makrophagen [83].

1.6.2. Bedeutung für den Gasaustausch

Die Druck-Volumen-Beziehung für die Lunge wird hinreichend durch das Gesetz von Laplace $\Delta p = 2\gamma / r$ (p : Druck; γ : Oberflächenspannung; r : Radius) beschrieben.

Daraus ergibt sich, dass bei steigender Oberflächenspannung γ eine größere Druckdifferenz Δp aufgebaut werden muß, um den Radius r eines gegebenen Hohlraumes konstant zu halten. Bei konstantem Druckgradienten Δp führt ein Anstieg Oberflächenspannung γ daher zu einer Erhöhung des Radius r .

Überträgt man das Gesetz von Laplace auf die Physiologie der Lunge, so führt eine erhöhte Oberflächenspannung γ zu einem Kollaps der kleinen Alveolen zu Gunsten von kommunizierenden größeren Alveolen, die dadurch noch größer werden (r wird größer). Für die maschinelle Druckbeatmung einer Lunge folgt daraus eine Erhöhung des aufzuwendenden Beatmungsdrucks (Steigerung von Δp), um das Kollabieren von kleineren Alveolen zu verhindern.

Daraus läßt sich die physiologische und klinische Bedeutung des pulmonalen Surfactantsystems und seiner Störungen ableiten. Diese wird besonders deutlich beim Infant Respiratory Distress Syndrome (IRDS) [162, 163, 164] und beim Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) [165] und äußert sich dort in einer verminderten Compliance (Dehnbarkeit) der Lunge, sowie in einem stark beeinträchtigten Gasaustausch. Bei Frühgeborenen hat sich hierbei als Therapie die exogene Surfactantapplikation bewährt [166, 167].

1.6.3. Antiödematöser Effekt

Eine Erhöhung der Oberflächenspannung bewirkt eine Erniedrigung des interstitiellen perivaskulären Drucks und führt zum Übertreten von Flüssigkeit in das alveoläre Lumen. Tierexperimentelle Untersuchungen bestätigen, dass eine Inaktivierung des Surfactant zur Entstehung eines Lungenödems führt, bzw. ein bereits bestehendes Ödem verschlimmert [168, 169, 170]. Dieser Zusammenhang lässt sich durch das Gesetz von Starling beschreiben:

$$\text{Exsudatmenge} = K_{f,c}[(P_c - P_i) - \sigma(\pi_{PI} - \pi_i)] - Q_{\text{Lymphe}},$$

mit $K_{f,c}$: kapillärer Filtrationskoeffizient; P_c : mittlerer Kapillardruck; P_i : mittlerer interstitieller Druck; σ : makromolekularer Reflektionskoeffizient; π_{PI} : onkotischer Plasmadruck; π_i : onkotischer interstitieller Druck; Q_{Lymphe} : Lymphabfluß.

Sowohl das IRDS wie auch das ARDS gehen ebenfalls mit einer erhöhten Permeabilität der epithelialen Schranke einher [171] und zumindest im IRDS-Modell ist diese durch eine exogene Surfactantapplikation teilweise reversibel [172, 173, 174].

1.6.4. Schutzfunktion und Immunkompetenz des Surfactantsystems

Surfactant erleichtert durch seine viskoelastischen rheologischen Eigenschaften den mucozilären Transport [175]. Er fördert die Clearance von Partikeln aus den kleinen Atemwegen [176], erhöht die Schlagfrequenz der Zilien [177] und beeinflusst die Viskosität des Mucus durch Stimulation des epithelialen Chloridionentransportes [178, 179, 180]. Surfactant beeinflusst den sogenannten "respiratory burst" neutrophiler polymorphkerniger Leukozyten durch Hemmung ihrer Superoxidproduktion [181]. Zudem ist er in der Lage, in Verbindung mit lipophilen Antioxidanzien wie Vitamin E, Sauerstoffradikale abzufangen und so eine hyperoxische Lungenschädigung zu verhindern [182, 183, 184].

Auf die Strukturverwandtschaft der Surfactantproteine SP-A und SP-D zu den Kollektinen wurde bereits hingewiesen. C-Typ-Lektine, auch Kollektine genannt, wie

z. B. Konglutinin, MBP und die Surfactantproteine üben vielfältige Abwehrfunktionen gegen Viren und Bakterien [111, 113, 118] aus. Zu den Abwehrfunktionen von SP-A und SP-D gehören die Aggregation von Viren und Bakterien, die Opsonierung von Antigenen, die Steigerung der Phagozytose, sowie die Modulation zellgebundener inflammatorischer Proteine. Kollektine stellen Vertreter der schnellen, unspezifischen Abwehr dar, wohingegen die spezifische Antikörperabwehr erst zeitverzögert wirksam wird.

SP-A und SP-D können offenbar auch die Entwicklung eines allergischen Asthmas eindämmen [185, 186]. Die Phagozytose von Herpes simplex Viren, Escherichia coli und Staphylococcus aureus durch Alveolarmakrophagen wird über spezifische SP-A-Rezeptoren aktiviert [111, 187, 188, 189]. SP-A ist außerdem in der Lage Endotoxine und Influenzaviren über Sialinsäurereste zu binden [190].

Als Mitglieder der Kollektinfamilie spielen SP-A und SP-D eine Rolle bei der Regulation von Phagozytose von infektiösen Erregern [111, 187, 188, 189], der Immunantwort [185, 176] und der Phospholipid-Clearance [191]. Ein Mangel an SP-A und SP-D führt über einen veränderten Phänotyp der Alveolarmakrophagen zur Akkumulation von Phospholipiden und somit schließlich zur Alveolarlipoproteinose und zum Lungenemphysem [118, 192].

1.7. Pathophysiologie des Surfactantsystems

1.7.1. Erkrankungen mit Veränderungen des Surfactantsystems

Das Inspiratory Distress Syndrome (IRDS) des Frühgeborenen zeichnet sich durch einen Mangel an funktionsfähigem, endogenem Surfactant aus und äußert sich wie ersteres vor allem durch eine verminderte Lungencompliance und einen erheblich gestörten Gasaustausch [162, 163, 164]. Die betroffenen Patienten werden zumeist beatmungspflichtig und sind oft selbst mit hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen von 60% und mehr kaum ausreichend zu oxygenieren. Die Ursache des IRDS liegt im Gegensatz zum ARDS jedoch vor allem in der mangelnden Synthesefähigkeit des noch unreifen Organismus. Ein Problem hierbei ist unter anderem die ungenügende Verfügbarkeit bzw. Mobilisation der für die Surfactantsynthese benötigten Substrate [193, 194, 195].

Beim ARDS ist das gesamte Surfactantsystem betroffen. Das pathophysiologische Geschehen äußert sich im Verlust oberflächenaktiver Komponenten, in Veränderungen der Phospholipid-, Fettsäure-, Neutrallipid- und der Apoproteinzusammensetzung, in der Imbalance der extrazellulären Surfactantsubtyp-Verteilung, der Hemmung der Surfactantfunktion durch Proteinexsudation in den Alveolarraum, durch Inkorporation von Phospholipiden und Apoproteinen in polymerisierendes Fibrin und schließlich in der Zerstörung von Surfactantkomponenten durch Entzündungsmediatoren [167]. Wie beim IRDS [196, 197, 198] könnte zumindest bei einigen Unterformen des ARDS die exogene Surfactantapplikation eine sinnvolle Therapieoption darstellen [199, 200, 201, 202].

SP-B ist essentiell für die Bildung der Lamellarkörperchen [203, 204]. Eine Reduktion des SP-B-Gehalts auf weniger als 25% des Normalniveaus führt in entsprechend genveränderten Mäusen zum Lungenversagen, die vollständige Deletion von SP-B ist in der Regel von Geburt an letal [205]. Eine Reduktion des SP-B-Gehalts und Erhöhung der Oberflächenspannung wird u.a. auch durch die Freisetzung von Eotaxin, IL-4 und IL-5 in der Lunge induziert. Dies geschieht z. B. bei Asthmareaktionen nach Exposition mit *Aspergillus flavus* [206].

SP-B-Nullmäuse sind zugleich verarmt an eigenem oder auch an maternalem SP-C, so dass in Studien mit solchen Tieren die Effekte des genetischen SP-B- und des funktionellen SP-C-Mangels überlappen. Wesentlicher Grund hierfür ist, dass das SP-C offenbar nur in Gegenwart von SP-B in der Typ-II-Zelle die sequentiellen, posttranslationellen Spaltungen des Proproteins durchläuft. Die SP-C knockout Maus ist prinzipiell lebensfähig und zeigt post partum einen vergleichbaren Gasaustausch und eine vergleichbare Lungenfunktion wie der Wildtyp [207]. Experimente mit diesen Mäusen unter hyperoxischen Bedingungen ergaben auch Hinweise für eine protektive Wirkung des SP-C bei einem, durch Hyperoxie induzierten, akuten Lungenschaden, wie es auch für SP-A nachgewiesen ist [208, 209]. Die üblicherweise im Langzeitverlauf zu beobachtende Entwicklung fibrosierender Veränderungen wird somit durch diese protektive Wirkung ebenfalls günstig beeinflusst.

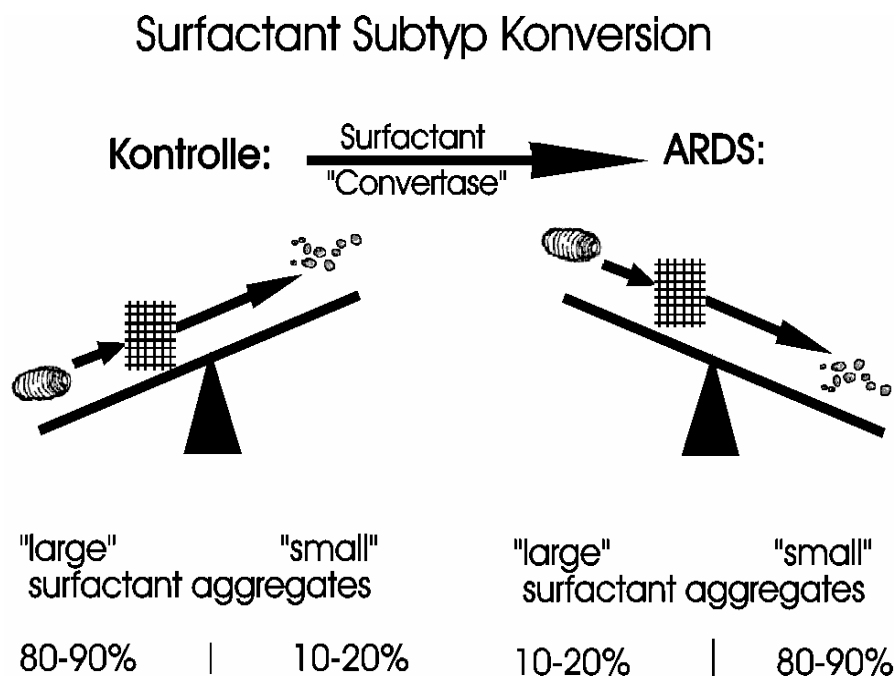
Bestimmte SP-C-Mutationen stehen darüber hinaus im Zusammenhang mit dem familiär gehäuften Auftreten idiopathischer interstitieller Pneumonitiden [210, 211, 212]. Mutiertes und in der Folge aggregiertes SP-C könnte hierbei durch langsame

Neben dem endogenen Surfactant können auch synthetische Surfactantpräparationen einen Schutz gegen eine durch Hyperoxie induzierte Schädigung des Epithels und Endothels bieten [213, 214, 215].

1.7.2. Pathophysiologische Aspekte des extrazellulären Surfactant-metabolismus

Nach Induktion eines Acute Lung Injury (ALI) im Tiermodell und auch unter den Bedingungen der in vitro Konversion wird das Verhältnis der aktiven LSA zu den inaktiven SSA zu Gunsten der SSA verschoben [216, 217]. Dies lässt sich auch bei der Analyse der Surfactantsubfraktionen von ARDS-Patienten bestätigen [218] (siehe Abb. 11).

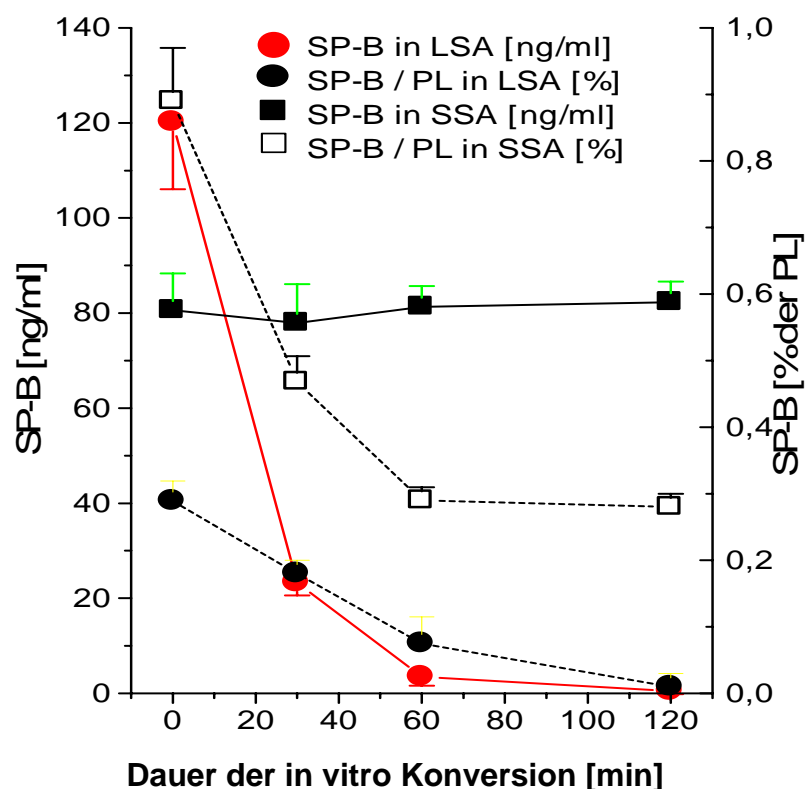
Abb. 11: Surfactantkonversion und Verhältnis von LSA zu SSA.



Unter dem Einfluß der sogenannten Konvertase, die der Familie der Carboxylesterasen angehört, werden die biophysikalisch hochaktiven LSA zu den weniger aktiven SSA degradiert. Dieser als Konversion bezeichnete Prozeß befindet sich normalerweise im Gleichgewicht mit Recycling und Neusynthese von Surfactant. Unter pathologischen Bedingungen, wie z. B. dem ARDS, kann dieses Gleichgewicht jedoch außer Kontrolle geraten.

Analysiert und vergleicht man darüber hinaus den SP-B-Gehalt der LSA und SSA nach Durchführung zyklischer Oberflächenveränderungen (in vitro Konversion) und in klinischen ARDS-Proben, so zeigt sich in beiden Fällen ein ausgeprägter Verlust an SP-B in den LSA, sowohl absolut, als auch bezogen auf den Phospholipidgehalt (siehe Abb. 12). In den SSA bleibt der absolute Gehalt an SP-B dagegen weitgehend konstant, zeigt sich jedoch, bezogen auf den Phospholipidgehalt, stark erniedrigt [219]. Vereinfacht ausgedrückt, scheint in den SSA eine "Verdünnung" des SP-B durch Übertritt der Phospholipide aus den LSA in SSA eingetreten zu sein. Dagegen ist der Verlust des SP-B-Anteils der LSA zunächst nicht zu erklären.

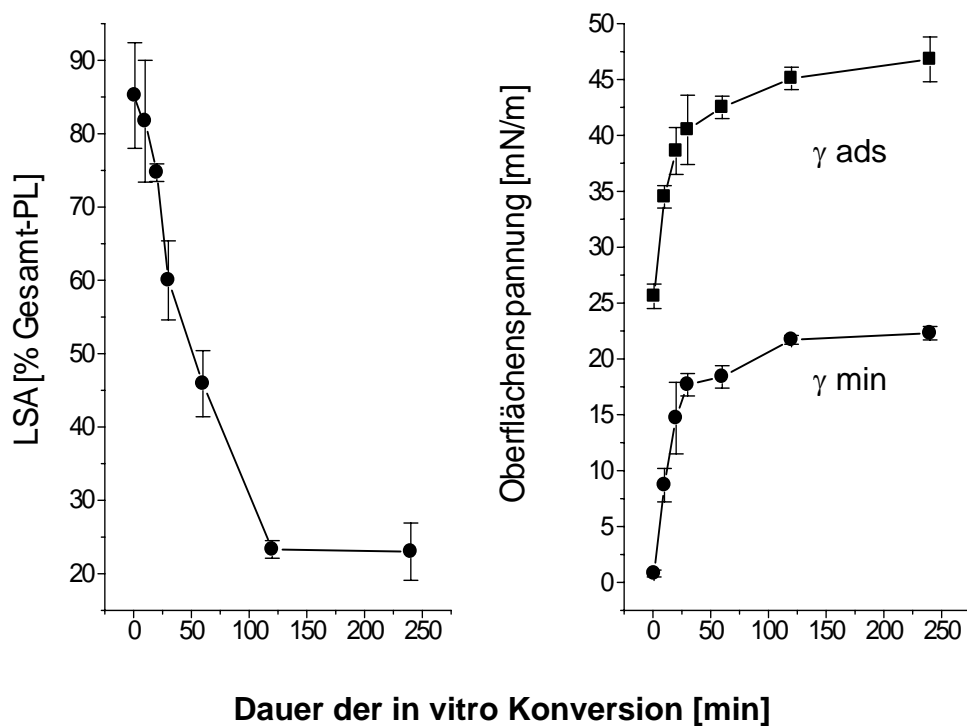
Abb.12: SP-B-Gehalt in den Surfactantsubfraktionen nach in vitro Konversion [219].



Andere nennenswerte Veränderungen der Zusammensetzung der LSA unter den Bedingungen einer Durchführung zyklischer Oberflächenveränderungen in vitro finden sich nicht. Vor allem lassen sich keine lipidchemischen Veränderungen bezüglich der Phospholipide, Fettsäuren und der Neutrallipide feststellen. Im Gegensatz dazu kann ein zeitabhängiger Verlust der Oberflächenaktivität festgestellt werden, der mit dem SP-B-Gehalt korreliert ist (Abb. 13).

Eine Schlüsselstellung des SP-B bei der metabolischen Sequenz der LSA zu SSA, die auch Gegenstand therapeutischer Interventionen sein könnten, ist auf der Basis dieser Ergebnisse also möglich und stellt den Ausgangspunkt dieser Arbeit dar.

Abb. 13: Veränderung von LSA-Gehalt und Oberflächenaktivität des Surfactant durch In vitro Konversion [219].



2. Fragestellung

Eine Vielzahl pneumologischer Erkrankungsbilder ist mit deutlichen Veränderungen des Surfactantsystems vergesellschaftet, die zur arteriellen Hypoxämie oder zum Complianceverlust beitragen könnten.

Neben biochemischen und auch biophysikalischen Veränderungen spielen auch Störungen des extrazellulären Metabolismus eine bedeutende Rolle. Dies möglicherweise nicht nur aufgrund einer gestörten Synthese der large surfactant aggregates, sondern auch aufgrund eines akzelerierten Abbaus dieser normalerweise biophysikalisch hochaktiven Subfraktion des alveolären Surfactant. Wesentliche Folge wäre also eine Prädominanz der inaktiven small surfactant aggregates, verbunden mit einem entsprechendem Anstieg der alveolären Oberflächenspannung. Eine vertiefte Kenntnis der dem extrazellulären Metabolismus zugrundeliegenden Mechanismen könnte also neue Perspektiven zur medikamentösen Therapie z. B. der akuten respiratorischen Insuffizienz eröffnen.

Der alveolären Surfactantkonversion liegt möglicherweise eine Carboxylesterase zugrunde [220, 221, 222, 223, 224, 225], entsprechend kann die Konversion in vitro durch Serinproteaseinhibitoren gehemmt werden [226].

Auf der Grundlage der oben beschriebenen klinischen und experimentellen Daten wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, ob zum einen eine Carboxylesterase die Surfactantkonversion vermitteln kann und zum anderen SP-B das Substrat in der enzymvermittelten Konversion darstellt.

Folgende Fragestellungen wurden im Detail bearbeitet:

- 1) Wie ist das Verhalten von enzymfreien Surfactantpräparationen auf natürlicher Basis nach Rekonstitution mit SP-A und Schweineleberesterase bezüglich der Konversion der Surfactantsubfraktionen unter zyklischen Oberflächenveränderungen in vitro?
- 2) Besteht eine Abhängigkeit der esterasevermittelten Konversion von PL-Aggregaten in synthetischen Surfactantpräparationen vom Surfactantproteinprofil?

- 3) Kann eine Spaltung von isoliertem SP-B durch Schweineleberesterase mit entsprechendem Nachweis eines Spaltproduktes mittels HPLC und SDS-PAGE erzielt werden?
- 4) Kann eine solche Degradation des SP-B durch Isolation des Spaltproduktes aus dem SDS-PAGE und N-terminaler Ansequenzierung desselben unter Beweis gestellt werden?

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Tab. 2: Geräte.

Hersteller	Gerät / Material
Agilent, Palo Alto, USA	HPLC 1100 Series
Applied Biosystems, Foster City, USA	Sequencer 477A
BAI, Bensheim	UV-Durchflussphotometer Kratos SF 770
Bakerbond, Deventer, Niederlande	3 ml Glassäulen
Beckmann, Palo Alto, USA	Ultrazentrifuge Spico L265B
Falcon, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich	Plastikgefäße mit Schraubdeckel- verschluss 15 ml und 45 ml
Du Pont, Bad Homburg	Zentrifuge Sorvall RC5C
Eppendorf, Hamburg	Plastikgefäße 2 ml
Fröbel Labortechnik GmbH	Rotationsgerät CMV
Grom, Rottenburg-Haifingen	HPLC-Säule 300 Octyl-6 MB, 5 µm, 250 x 4 mm
Hamilton, Darmstadt	Mikroliterspritzen
Heraeus, Hanau	Ultrazentrifuge Omega II70, Varifuge 3.OR
Hettich, Tuttlingen	Laborzentrifuge Rotanta / RP
Kontron, München	Spektralphotometer Uvikon UV 860
Macherey und Nagel, Düren	Filterelemente für Glassäulen 3 ml
Mettler, Gießen	Laborwaage AJ 100
Nunc, Wiesbaden	Mikrotiterplatten Polystyrol 96 well
Pharmacia Biotech, Freiburg	FPLC Äkta Explorer
RediFrac, Pharmacia, Freiburg	Fraktionssammler
Rohde & Schwarz, Köln	Flachbrettschreiber
Tecan, Männedorf, Schweiz	ELISA-Photometer Spectrafluor Plus
Uniequip, Martinsried	Speedvac Univapo 150 H
Von Keutz, Reiskirchen	Elektrophoreseapparatur Netzgerät Consort

3.1.2. Chemikalien

Tab. 3: Substanzen.

Hersteller	Substanz
Amersham, Amersham, GB	Anti-Maus-Antikörper (Schaf)
Baker, Groß-Gerau	Methanol p.a.
Boehringer, Mannheim	ABTS
Braun, Melsungen	NaCl-Lösung 0.9%
Byk-Gulden, Konstanz	SP-A human, rekombinant
Dako, Hamburg	AB-Komplex
Fluka, Neu-Ulm	Methanol HPLC-Grade
Hoechst Roussel, Frankfurt	Hostacain (Butanilincain)
Merck, Darmstadt	2-Propanol HPLC-Grade (Lichrosolv), Chloroform p.a., Ammoniumheptamolybdat, Ascorbinsäure, Kaliumdihydrogenphosphat, Perchlorsäure 70%, Essigsäure 100%, Salzsäure 37%, Wasserstoffperoxid 30%, 1-Propanol p.a., Trifluoressigsäure, Nickel-(II)-Chlorid, Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Calciumchlorid, Ammoniumperoxodisulfat, Tricin, Dithiothreitol, Tris
Messer Griesheim, Krefeld	Stickstoff 4.0
Millipore, Eschborn	PVDF-Membran, Immobilon P ^{SQ} ®
Paesel & Lorey, Frankfurt	Rinderserumalbumin
Pierce, via Bender & Hohlbein, München	D-Mannose, BCA-Protein-Assay
Serva, Heidelberg	Serva Blue G250, Triton X-100, Acrylamid, Bisacrylamid, SDS
Sigma, Deisenhofen	Sephadex LH-60, Tween 20, TEMED, Glycine, DAB, Esterase (porcine liver), p-Nitrophenolacetat (pNPA)
Y. Suzuki, Department of Biochemistry, Sapporo, Japan	Monoklonaler Antikörper 8B5E (Maus) gegen SP-B (human)
Sanofi, München	Nembutal [®] (Pentobarbital)

3.2. Allgemeine Methoden

3.2.1. Gewinnen von Surfactant aus Kaninchenlunge

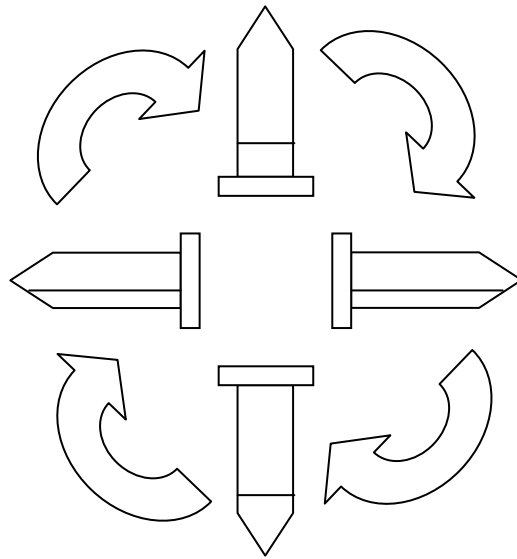
Die Gewinnung von natürlichem Surfactant erfolgte durch Lavagieren von Kaninchenlungen mit 0.9%iger Kochsalzlösung. Die Tiere wurden zu diesem Zweck durch intravenöse Verabreichung einer Mischung von je 0.3 g Ketanest und Nembutal[®] getötet. Nach Präparation und Eröffnen der Trachea erfolgte die Lavage durch portionsweises Einspritzen und Aspirieren von insgesamt ca. 200 ml Kochsalzlösung pro Tier. Die Spüllösung wurde 15 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand über Mull filtriert, um aspirierte Zellen und Schleimb Bestandteile zu entfernen. Die so erhaltenen bronchoalveolären Lavagen (BAL) der einzelnen Tiere wurden vereint (gepoolt) dann zu je 5 ml aliquotiert. Die Aliquots wurden jeweils in Kunststoffröhrchen mit 15 ml Fassungsvermögen und Schraubdeckelverschluss (Falcon, Becton Dickinson) überführt und bei –20°C gelagert.

3.2.2. "In vitro Konversion"

Im in vitro Modell der Surfactantkonversion wurden die periodischen Oberflächenveränderungen der Wasser-Luft-Grenzfläche in den Alveolen imitiert. Dazu wurden die Probengefäße mit einer Geschwindigkeit von 16 rpm, entsprechend einer 32-maligen Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Luft-Wasser-Grenzfläche, über Kopf rotiert (siehe Abb. 14).

Die in vitro Konversionsversuche mit zellfreier BAL bzw. resuspendierten BAL-Proben und verschiedenen Surfactantpräparationen wurden mit Probenvolumina von 5 ml in den oben genannten verschließbaren 15 ml Kunststoffröhrchen durchgeführt. Versuche mit isoliertem SP-B und Schweineleberesterase in einem Gesamtvolumen von 1 ml erfolgten in 2 ml Reaktionsgefäßen aus Kunststoff mit Schnappdeckelverschluss (Eppendorf). Die Rotation der Proben erfolgte in einem Inkubator bei 37°C für 4 h.

Abb. 14: Prinzip der in vitro Konversion



3.2.3. Isolierung von large surfactant aggregates

Zur Isolation der LSA wurde BAL oder rekonstituierte Surfactantsuspensionen 1 h bei 48 000 x g zentrifugiert. Dabei sedimentierten die large surfactant aggregates (LSA), die Lamellarkörperchen, tubuläres Myelin und multilamelläre Vesikel enthalten, wohingegen die small surfactant aggregates (SSA) im Überstand verblieben. Die Zentrifugation erlaubte somit die Isolierung der unter physiologischen Bedingungen oberflächenaktiven LSA, die Ermittlung des LSA / SSA-Verhältnisses und somit die Beurteilung des Konversionsgrades nach Konversion in vivo und in vitro.

3.2.4. Extraktion der hydrophoben Surfactantkomponenten

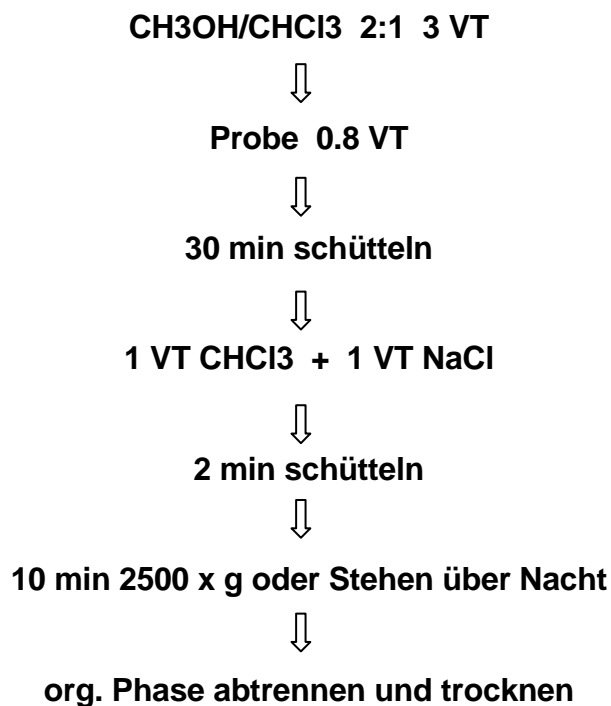
Zur Extraktion hydrophober Bestandteile kamen grundsätzlich mehrere Verfahren in Betracht, wie z. B. die Butanol- Extraktion nach Daee & Bremer [227, 228] oder die Hexan-Isopropanol-Extraktion nach Christiansen [229]. Am häufigsten wurde für Phospholipide und Neutralfette die Zweiphasenextraktionen mit Chloroform und Methanol nach der Methode von Folch [230] oder der nach Bligh & Dyer angewandt [231]. Die Wiederfindungsrate lag bei all diesen Verfahren bei 90-100% [230, 231, 232].

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Methode nach Bligh & Dyer verwendet, weil diese die geringsten Lösungsmittelmengen benötigt.

Dazu wurden zunächst 3 relative Volumenanteile (VT, bezogen auf 0.8 Volumenanteile BAL-Probe) eines 2:1 Gemisches von Methanol und Chloroform in einem Glaszentrifugenröhrchen oder einem Schütteltrichter, je nach Gesamtmenge, vorgelegt. Nach Probenzugabe wurde das Gefäß über einen Zeitraum von ca. 30 min wiederholt eine Minute lang geschüttelt. Dann wurden je 1 Volumenanteil Chloroform und 0.9%ige NaCl-Lösung zugegeben und wiederum für zwei Minuten geschüttelt. Zur vollständigen Phasentrennung wurden die Ansätze nun entweder 10 min bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert oder bei gleicher Temperatur über Nacht stehen gelassen (siehe Abb. 15).

Die untere organische Phase wurde mittels Pasteurpipette aus dem Zentrifugenröhrchen separiert und im Stickstoffstrom getrocknet.

Abb. 15: Lipidextraktion nach Bligh & Dyer.



3.2.5. Quantifizierung der Gesamphospholipide mittels colorimetrischer Phosphatbestimmung

Die Ermittlung des Gesamphospholipidgehaltes erfolgte über die Bestimmung des Phosphorgehaltes in der Probe mittels einer modifizierten Methode nach Rouser et al. [233, 234, 235, 236]. Das Detektionslimit konnte so auf 2 µg Phospholipid bzw. 100 ng Phosphor gesenkt werden.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe aus einer wässrigen Stammlösung von 3.22 mol/l Kaliumdihydrogenphosphat (entsprechend einem Gehalt von 0.1 mg/ml Phosphor) vorbereitet. Die Standardwerte reichten hierbei von 0.2 - 5 µg Phosphor absolut. Sowohl Standards als auch die Proben wurden in Reagenzgläsern mit 200 µl 70%iger Perchlorsäure versetzt und eine Stunde bei 200°C inkubiert. Durch die quantitative Oxidation des lipidgebundenen Phosphates wurde dessen Nachweis als freies Phosphat möglich und lieferte bei gleichem Phosphatgehalt mit den Standards identische Werte.

Nach dem Abkühlen wurden die Proben und Standards mit je 1 ml einer 4.6 mM Ammoniumheptamolybdat- und 20 µl einer 0.65 M Ascorbinsäure-Lösung versetzt und zur Reduktion zum blauen Farbkomplex 60 Minuten bei 60°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die spektralphotometrische Messung bei $\lambda = 698 \text{ nm}$. Mittels einer Regressionsgeraden wurde nach Abzug des Leerwertes der Phospholipidgehalt bestimmt, wobei die mittlere relative Molekularmasse für Phospholipide mit $M(r) = 734 \text{ g/mol}$ angenommen wurde.

3.2.6. Isolation der Surfactantproteine aus Lavage

Zur Isolation von SP-A aus BAL kamen zwei Verfahren zur Anwendung. Zum einen die Affinitätschromatographie mit D-Mannose und zum anderen die Chromatographie über einen Anionenaustauscher.

3.2.6.1. SP-A-Präparation mit Mannose-Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie wurde die Fähigkeit des SP-A Ca^{2+} -abhängig Kohlenhydrate zu binden ausgenutzt. Die Auftrennung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Kuroki et al. [26, 237] über eine Affinitätschromatographie mit D-Mannose [238]. Da die wasserlöslichen Proteine in Gegenwart von Chloroform denaturieren, wurde zur Delipidierung stattdessen eine Extraktion mit 1-Butanol durchgeführt [239].

Probenvorbereitung

Für die Extraktion wurde die BAL für 1 h bei 48 000 x g zentrifugiert und das Pellet in geringem Volumen 0.9%iger NaCl-Lösung wiederaufgenommen. Die nun konzentrierte BAL (ca. 10 mg PL / ml) wurde mit einem 50ig-fachen Überschuss an Butanol versetzt und 1 h gerührt. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 2000 x g wurde der Überstand dekantiert und das Sediment in 10-30 ml eines 5 mM Tris/HCl-Puffers (pH 7.4) wiederaufgenommen, restliches Butanol wurde im Stickstoffstrom entfernt. Darauf erfolgte die Dialyse gegen 5 mM Tris/HCl (pH 7.4) + 0.02% NaN_3 mit einem Dialyseschlauch von Sigma, Ausschlußgröße 12 kDa.

Um weitere Proteine abzutrennen wurde schließlich noch eine Ultrazentrifugation bei 120 000 x g für 1 h durchgeführt, der Überstand wurde für die Chromatographie eingesetzt.

Affinitätschromatographie

Vor der Probenaufgabe wurde die Mannosesäule (4 x 3 cm) über mehrere Stunden mit Elutionspuffer (5 mM Tris/HCl, pH 7.4 + 2 mM EDTA (Dinatriumsalz) + 0.02% NaN_3) gespült und anschließend noch 1 h mit Äquilierungspuffer (5 mM Tris/HCl, pH 7.4 + 1mM CaCl_2 + 0.02% NaN_3) eingestellt. Dies erfolgte unter einem hydrostatischem Druck von 30 cm Wassersäule, vor der Probenaufgabe wurde der Fluss auf ca. 3 ml/min reguliert.

Die vorbereitete Probe wurde bis zu einer Konzentration von 1 mM mit CaCl_2 versetzt und auf die Säule gegeben. Nach Eintritt in das Gelbett wurde zunächst mit Äquilierungspuffer gespült bis das Signal Durchflußphotometers bei $\lambda = 279 \text{ nm}$ stabil war. Dann wurde die Elution mit Elutionspuffer begonnen und das Eluat in Fraktionen von 150 Tropfen gesammelt.

Der SP-A-Gehalt der Fraktionen wurde mittels des BCA-Protein-Assays (siehe unten), SDS-Gelelektrophorese und SP-A-ELISA bestimmt. Danach wurden die entsprechenden Fraktionen gepoolt und der Reinheitsgrad mittels SDS-PAGE überprüft.

3.2.6.2. SP-A-Präparation mittels Anionenaustauschchromatographie

Die Verwendung von Anionenaustauscher-Säulen in der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie hat sich als schnelle analytische, semi-quantitative Methode bereits für die Isolation einer Reihe von Plasmaproteinen, Antikörpern, Ganglioside und Nucleotiden bewährt [240, 241, 242, 243, 244].

Die hier verwendeten Mono Q-Säulen sind im Vergleich zu Mannose-Säulen weniger anfällig für bakterielle Besiedelung. Zudem wird an die Mannose-Säule auch SP-D gebunden, ein weiterer Nachteil gegenüber dem Mono Q-Material.

Probenvorbereitung

Auch hier wurde zur Abtrennung der Lipide die Butanol-Extraktion mit der konzentrierten BAL und einem fünffachen Überschuss des Lösungsmittels durchgeführt. Nach 5 h Rühren bei RT wurde der Niederschlag durch Zentrifugation und vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes separiert und lyophilisiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Lyophilisat wurde in Aufgabepuffer (20 mM Ethanolamin, pH 9.2) aufgenommen und über Nacht gegen Aufgabepuffer dialysiert. Die dialysierte Probe wurde über eine Mono Q-Säule (Anionenaustausch) aufgetrennt.

Anionenaustauschchromatographie

Die FPLC-Läufe wurden mit dem Anionenaustauscher Mono Q als Säulenmaterial durchgeführt. Dieses enthält quartäre Ammoniumgruppen, die mit negativen Ladungen wechselwirken können. SP-A ist ein saures Protein, welches bei pH 9 negativ geladen ist. Als Aufgabepuffer wurde dementsprechend 20 mM Ethanolamin pH 9.2 (Puffer A) verwendet, die Elution erfolgte mit einem Salzgradienten beginnend mit reinem Aufgabepuffer und steigendem Anteil an 1 M Kochsalzlösung (Puffer B). Die Durchführung des Gradienten war erfolgte zwei Schritten: 0 - 50% Puffer B in 30 Säulenvolumina (= 30 ml), 50 - 100% Puffer B in 10 Säulenvolumina (= 10 ml).

Detektion und Sammeln der Fraktionen, sowie deren Analytik und Charakterisierung erfolgte wie bei der Affinitätschromatographie beschrieben. Die Elution des SP-A erfolgte demnach bei 300 - 400 mM NaCl.

3.2.6.3. Präparation von SP-B und SP-C mit LH-60-Chromatographie

Das Verfahren der Wahl zur Auftrennung und Reinigung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B Monomer, SP-B Dimer und SP-C ist die lipophile Gelpermeationschromatographie mit Sephadex LH-60 (Sigma, München) nach Warr et al. [245].

Probenvorbereitung

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Surfactantproteine diente BAL vom Kaninchen, die zunächst mittels Zentrifugation (300 x g, 10 min) und Mullfiltration zelldepletiert und dann über eine zusätzliche Zentrifugation (48 000 x g, 1 h) konzentriert wurde. Das in möglichst wenig Volumen 0.9%iger NaCl-Lösung resuspendierte Pellet wurde einer Lipidextraktion nach Bligh & Dyer unterzogen, die SP-B- und SP-C haltige Chloroformphase getrocknet und zur Aufgabe auf die Säule in einem kleinem Volumen der mobilen Phase, welche im Folgenden noch beschrieben werden wird, wiederaufgenommen.

LH-60-Chromatographie

Die mit Sephadex beschickte Säule (1.5 x 100 cm) wurde zunächst mehrere Tage bei 4°C mit dem Laufmittel LH-60-Puffer bestehend aus 47.5 vol. % CH₂Cl₂, 47.5 vol. % CH₃OH, 5 vol. % 0.1 N HCl äquiliibriert. Die Probe wurde dann in einem maximalen Volumen von 3 ml Laufmittel aufgegeben, wobei die Kapazität der Säule auf 400 mg Phospholipid (entsprechend ca. 25 mg SP-B Dimer) pro Lauf beschränkt war. Nach Eindringen der Probe in das Gelbett wurde nochmals mit 3 ml Laufmittel gespült. Anschließend erfolgte die Gelpermeationschromatographie unter einem hydrostatischem Druck von 20 cm H₂O und einem Flow von ca. 0.2 ml/min. Unter diesen Bedingungen betrug die Laufzeit ca. 20 h. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 300 Tropfen gesammelt und mit einem Durchflussphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 279$ nm detektiert.

Die weitere Charakterisierung der gesammelten Fraktionen erfolgte über die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (siehe unten) und über SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinheit.

3.2.6.4. Separation von SP-B, Spaltprodukten, Phospholipiden und SP-C mittels reversed phase (rp) HPLC

Die rp HPLC nutzt zur Auftrennung sowohl hydrophobe Wechselwirkungen mit Kohlenstoffseitenketten des Säulenmaterials, als auch unterschiedliche Elutionseigenschaften der aufzutrennenden Proteine aus. Damit bietet diese Methode Vorteile für die Analytik der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C [246] aus isolierten Reaktionsansätzen oder auch aus der Lavage bzw. LSA.

Probenvorbereitung

Zwei Aliquots von Kaninchen BAL zu je 5 ml wurden aufgetaut und 1 h bei 48 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, um einen Großteil der enthaltenen Verunreinigungen zu entfernen. Die Pellets wurden in je 5 ml Konversionspuffer resuspendiert. Eine Probe wurde 20 h bei 37°C rotiert, die andere lediglich 20 h bei

37°C inkubiert. Dann wurden beide Proben einer Trennung nach Bligh und Dyer unterzogen. Die wässrige Phase wurde verworfen. Die Konversionsgefäße wurden zum Abspülen von möglicherweise an der Wand anhaftenden Bestandteilen mit 1.5 ml 80%igem Isopropanol 30 min rotiert und die Spüllösung anschließend lyophilisiert. Die Rückstände wurden in je 200 µl 0.9%iger NaCl-Lösung aufgenommen und ebenfalls einer Bligh und Dyer-Trennung zugeführt. Die wässrige Phase wurde auch hier verworfen, die organischen Phasen beider Trennungen wurden vereinigt und im N₂-Strom getrocknet.

Reversed Phase HPLC

Die Rückstände wurden in 200 µl Ethanol aufgenommen und auf die HPLC-Säule gegeben. Verwendet wurde eine C8-Säule 100 bzw. 300 Octyl 6 MB, 5 µm 250 x 4 mm. Eluiert wurde mit einem linearen Lösungsmittelgradienten beginnend mit 100% Phase A (40% Methanol + 0.1% TFA) und nach 40 Minuten endend mit 100% Phase B (100% Isopropanol + 0.1% TFA). Es wurden fortlaufend 2 ml Fraktionen gesammelt und mittels eines DAAD-Detektors bei 220 nm und 279 nm detektiert. Die Fraktionen wurden z. T. gepoolt, getrocknet und per SDS-PAGE analysiert.

3.2.7. Proteinbestimmungen

3.2.7.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode [247, 248] zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen ist als kommerzieller Kit (Pierce, via Bender & Hohlbein, München) erhältlich. Wie auch bei der Proteinbestimmung nach Lowry [249, 250] wird hier das nach der Biuret-Raktion entstandene Cu⁺ als farbiger Komplex gebunden. Zwei Moleküle Bicinchoninsäure bilden mit Cu⁺ in alkalischem Medium einen wasserlöslichen violetten Chelatkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm.

Durchführung des BCA-Protein-Assay

Aus praktischen Gründen wurde der Assay auf Polystyrol-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt [251]. Rinderserumalbumin (BSA) diente als Referenzprotein in Konzentrationsbereichen von 2 µg / ml bis 1.5 mg / ml. Die Puffer waren sowohl für die Proben als auch für die Standards dieselben. Mehrere Leerwerte wurden mitgeführt. Die Standards und Proben wurden in Volumina von 50 µl in die Nüpfchen vorgelegt und mit je 200 µl BCA-Reagenz versetzt. Diese besteht aus einer Lösung von Natriumcarbonat, -bicarbonat und -tartrat, sowie BCA-Detektionsreagenz in 0.2 N NaOH zuzüglich 0.08% Cu₂SO₄. Nach 30 Sekunden Schütteln und 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Mikrotiterplatte bei 550 nm mit einem ELISA-Photometer gemessen. Die Auswertung erfolgte durch polynome Regression.

3.2.7.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung der hydrophoben Surfactantproteine mittels der BCA-Methode bereitet aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit einige Probleme, so dass hier alternative Quantifizierungsmethoden zur Anwendung kommen mussten. Zudem führt die Methode nach Lowry beim SP-C aufgrund der fehlenden Tyrosinreste zu falsch niedrigen Werten. Als viel geeigneter erwies sich hierbei das Verfahren nach Bradford [252, 253]. Die Quantifizierung erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Peptidsegmenten und einem Farbstoff (Serva Blue G oder Coomassie Brilliant Blue). Aufgrund der beschriebenen schlechteren Anfärbbarkeit von SP-B und SP-C im Vergleich zum Standard Rinderserumalbumin war ein experimentell bestimmter Korrekturfaktor einzuführen [254].

Herstellung des Bradford-Reagenzes

Es wurden 100 mg Serva Blue G 250 in 50 ml 95% Ethanol gelöst und mit 100 ml 85% Phosphorsäure versetzt. Danach wurde auf ein Gesamtvolumen von 1 l aufgefüllt und filtriert. Die Zusammensetzung entsprach schließlich 0.01% Serva Blue G 250, 4.75% Ethanol und 8.5% Phosphorsäure.

Durchführung des Bradford-Assay

Definierte Volumina der Standards (BSA, 1, 2, 5, 10 und 20 µg) und zu untersuchenden Proben wurden lyophilisiert und in 50 µl 2-Chlorethanol wiederaufgenommen und gut geschüttelt. Nach Zugabe von 800 µl Wasser und 800 µl Bradford-Reagenz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die spektralphotometrische Messung gegen einen Leerwert bei 595 nm. Die Auswertung erfolgte mittels polynomer Regression.

Der Vergleich von Ergebnissen aus MS und Bradford-Assays unter Verwendung ein und desselben rekombinanten SP-C Standards hatte gezeigt, dass die so erhaltenen Rohwerte noch durch einen Korrekturfaktor 0.66 (siehe oben) zu dividieren waren. Die Notwendigkeit dieses Korrekturfaktors ergibt sich aus den hydrophoben Eigenschaften der untersuchten Proteine und deren entsprechend schlechter Anfärbbarkeit mit den überwiegend hydrophilen Färbereagenzien.

3.2.8. Gelelektrophoresen und Western Blots

3.2.8.1. Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch Denaturierung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und ein stark basisches Milieu wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen innerhalb eines Polyacrylamidgels, angetrieben durch ein äußeres elektrisches Feld, lediglich durch deren Molekularmasse bestimmt. Anschließend können die aufgetrennten Proteine durch verschiedene Färbeverfahren als Banden sichtbar gemacht werden. Je nach Beschaffenheit der zu analysierenden Proteine kann das Polyacrylamidgel in Dicke, Größe, Vernetzungsgrad und Porengröße variiert werden.

Die Gelelektrophoresen zur Auftrennung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C wurden mit frisch zubereiteten Acrylamidgelen nach Schagger und Jagow [255] durchgeführt, die wie folgt pipettiert wurden:

Tab. 4: Pipettierschema Schägger–Jagow-Gel

Trenngel (16.5% Gesamtacrylamid-Konz.)	7 ml Acrylamid-Lsg. (49.5% Acrylamid, 6% Bisacrylamid) 7 ml Gelpuffer (3 mM Tris/Cl pH 8.45, 0.3% SDS) 2.24 ml Glycerin 87% 0.014 ml TEMED 4.6 ml H ₂ O 0.18 ml APS
Zwischengel	2 ml Acrylamid-Lsg. A (49.5% Acrylamid, 3% Bisacrylamid) 3.3 ml Gelpuffer 0.006 ml TEMED 4.6 ml H ₂ O 0.12 ml APS
Sammelgel	0.8 ml Acrylamid-Lsg. A 2.5 ml Gelpuffer 0.016 ml TEMED 6.6 ml H ₂ O 0.18 ml APS
Elektrophoresepuffer:	0.2 mM Tris (Anode) 0.1 M Tris, 0.1M Tricin, 0.1% SDS (Kathode)

Vorbereitung der Gele

Zunächst wurden zwei Glasplatten mit Wasser und Ethanol gründlich gereinigt und, getrennt von zwei Abstandshaltern (1mm Dicke) rechts und links, übereinandergelegt. Die Glasplatten wurden mit festem Klebeband (Durapore, 3M Health Care, USA) und Klammern fixiert und in die Kammer eingespannt. Erst kurz vor dem Gießen der Gel-Lösungen wurde der Polymerisationsstarter APS zugegeben. Schichtweise wurden nun die Gel-Lösungen mittels Einmalspritzen von Braun zwischen die Glasplatten gegossen, zuerst das Trenngel, darüber vorsichtig das Zwischengel. Bis zum Erhärten wurden die beiden Schichten mit einer uberschichtungslosung (1 M Tris, 0.33 M HCl,

0.1% SDS) vor dem Austrocknen geschützt. Nach dem Durchhärten wurde die Überschichtungslösung abgegossen, der Kamm eingesetzt und das Sammelgel gegossen. Nach dem das Sammelgel fest geworden war, wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die Kammern mit den Elektrophoresepuffern befüllt, die Geltaschen mit dem Puffer gespült und dann die Proben hineinpipettiert.

Trennung

Die Elektrophorese wurde zunächst mit 30 V begonnen, bis die Proben vollständig in das Sammelgel eingedrungen waren und dann bei 130 V fortgeführt. Bei einem 16.5%igen Acrylamidgel dauerte eine Elektrophorese insgesamt ca. 8 h.

Entwicklung und Färbung

a) Coomassiefärbung

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 30 min in 50% Methanol, 10% Eisessig fixiert und dann in einer Lösung von 250 mg/l Serva Blue G (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in 50% Methanol, 10% Eisessig für 90 min gefärbt. Anschließend wurde wiederum in einer Lösung von 50% Methanol, 10% Eisessig über Nacht entfärbt.

b) Silberfärbung

Nach Reduktion des entfärbten Gels mit DTT (1µg / ml) für 30 min und zweimaligem Waschen mit Wasser erfolgte die Silberfärbung mit AgNO_3 / NH_3 für 15 min. Nach gründlichem Waschen mit Wasser wurde das Gel mit einer Lösung von 0.1% Zitronensäure, 0.05% Formaldehyd in Wasser entwickelt.

Tab. 5: Procedere Gelfärbung.

Schritt	Reagenz	Zeit [min]
Fixieren	50% Methanol + 10% Eisessig	30
Färben	250 mg / l Serva Blue + 10% Eisessig	90
Entfärben	50% Methanol + 10% Eisessig	über Nacht
Reduktion	5 µg / ml DTT	30
Spülen	Wasser	2 x 10
AgNO ₃ -Färbung	A: 7 ml konz. NH ₃ (25%) + 75 ml NaOH (50%) ad 250 ml H ₂ O B: 3.9 g AgNO ₃ ad 250 ml H ₂ O 40 ml B werden unter Rühren zu 40 ml A gegeben	15
Spülen	Wasser	4 x 1
Entwickeln	2 ml 2.5% Zitronensäure + 0.5 ml Formaldehyd (37%) ad 1000 ml	bis Farbe
Stoppen	10% Eisessig	15

Von allen insgesamt durchgeführten Gelversuchen wurde aus $n \geq 3$ nur jeweils ein repräsentatives Gel in dieser Arbeit abgebildet.

3.2.8.2. Western Blot und N-terminale Sequenzierung

Die Identifizierung einzelner gelelektrophoretisch aufgetrennter und auf Membranen transferierter Proteine mit Hilfe von Antikörpern ermöglicht einen gezielten und spezifischen Nachweis [256]. Hier wurde die Western Blot-Technik allerdings nicht zum antikörperbasierten Nachweis von Proteinen verwendet, sondern dazu gebraucht, die separierten Proteine aus dem Gel heraus auf eine Membran zu transferieren, aus der die N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau gut gelingt. Die Sequenzanalyse aus dem SDS-PAGE direkt ist nicht möglich.

Für Western Blots zur N-terminalen Sequenzierung wurden Immobilon-P^{SQ} – Membranen verwendet. Als Transferpuffer wurde eine Lösung von 125 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20% Methanol und 0.01% SDS in Wasser verwendet.

Äquilibration

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 5 min in Transferpuffer (siehe oben) äquilibriert. Ebenso wurde die vorbereitete PVDF-Membran zunächst 1 Minute in 100% Methanol, dann 2 Minuten in destilliertem Wasser und schließlich für 2 Minuten in Transferpuffer äquilibriert.

Transfer

Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran wurde das Gel und die Membran "sandwichartig" zwischen 2 x 6 Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Die so geschichteten Filterpapiere mit Gel und Membran wurden dann zwischen die Kohleplattenelektroden (unten Anode, oben Kathode) platziert und mit einer Glaspipette von gefangenen Luftblasen befreit. Bei allen Schritten wurde auf Fettfreiheit geachtet und daher mit Gummihandschuhen und Pinzetten gearbeitet. Anschließend erfolgte das Blotting mit einer Stromstärke von $0.8 \text{ mA} / \text{cm}^2$ Gel über einen Zeitraum von 90 Minuten.

Präparation der Membran für die Sequenzanalyse

Da aus den geblotteten Proteinen eine Sequenzanalyse erfolgen sollte war eine Detektion über Antikörpergebundene Farbreaktionen nicht anwendbar. Eine Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Blue ist hierbei jedoch nicht störend. Hierzu wurde die Membran für ca. 10 Sekunden in Coomassie Blue gefärbt und anschließend 24 h gewässert (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Präparation der Membran für Sequenzierung.

Färbelösung	0.1% Coomassie R 250 40% Methanol 1% Essigsäure 59% Wasser
Entfärbelösung	50% Methanol 50% Wasser
Procedere	nach dem Blotten 3 s in Methanol 10 s Färben kurz Entfärben 24 h Wässern

Alle Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt.

Da sich die hydrophoben Surfactantproteine nur sehr schlecht mit Coomassie Blue anfärben lassen, wurde das Gel nach dem Blotten der oben beschriebenen Färbereaktion (siehe Tab. 5) unterworfen. Durch Übereinanderlegen von gefärbtem Gel und Blot und Beleuchtung von unten konnten die Banden, die im Gel, nicht jedoch auf der Membran sichtbar geworden waren, lokalisiert und entsprechend ausgeschnitten werden.

Die N-terminale Sequenzierung erfolgte nach dem Edman-Abbau mit dem Protein Sequencer 477A von Applied Biosystems in Zusammenarbeit mit dem Biochemischen Institut der JLU Gießen.

3.2.9. SP-B- und SP-C-ELISA

Für SP-B- und SP-C-ELISAs wurden Mikrotiterplatten mit 96 Näpfchen aus Polystyrol der Firma Nunc, Wiesbaden Typ Polysorb® F96 verwendet. Für ELISAs aus HPLC-Proben konnte ein im Vergleich zu BAL-Proben vereinfachtes Protokoll verwendet werden, dass im Folgenden beschrieben wird. Humanes, dimeres SP-B diente als Standard und wurde hierzu über eine LH-60-Chromatographie aus humanen Lavagen isoliert und anschließend dessen Proteinkonzentration mittels Bradford Assay

bestimmt. Dabei wurde die reduzierte Anfärbbarkeit des Proteins wiederum durch den oben genannten Korrekturfaktor von 0.66 berücksichtigt. Die zu erwartende hohe Reinheit des Proteins wurde in der Gelelektrophorese und im Western Blot bestätigt. Die Proben für SP-B-ELISA wurden mit 1-Propanol und PBS so verdünnt, dass das Verhältnis von 1-Propanol zu PBS 1:1 in einem Probenvolumen von 250 µl betrug. Die SP-B-Standards wurden ebenfalls mit 1-Propanol/PBS 1:1 seriell verdünnt, ausgehend von einer Konzentration von 100 ng/well bis 3.125 ng/well. Die Proben und Standards für SP-C-ELISA wurden in 80% Isopropanol, pH 3.0 gelöst. Die serielle Verdünnung der Standards erfolgte analog zu den SP-B-Standards.

Alle Proben und Standards wurden als Doppelbestimmungen eingesetzt. Sämtliche Verdünnungen erfolgten in 2 ml Reaktionsgefäßen der Firma Eppendorf, Hamburg.

Nach dem Aufbringen der Proben wurden die Mikrotiterplatten 6 h bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Zum Blockieren noch vakanter Bindungsstellen auf der Platte wurde 2 h mit 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 0.5% Tween 20 erfolgte für SP-B-ELISA die Aufgabe des SP-B-Antikörpers 8B5E (monoklonal) von der Maus gegen porcines SP-B. Hierzu wurde die Antikörperstammlösung (1 mg/ml) in 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% BSA im Verhältnis 1:200 verdünnt. Für SP-C-ELISA wurde als erster Antikörper die Stammlösung eines patentierten Antikörpers Ak 4 (Byk-Gulden, 1mg/ml) in einer Verdünnung von 1:2000 in 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% BSA verwendet. Davon wurden 200 µl pro well pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 0.5% Tween (200 µl/well) wurden 200 µl einer 1:1000-Verdünnung von biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper vom Schaaf (Amersham-Buchler, Braunschweig) für SP-B-ELISA, bzw. Anti-Kaninchen-Antikörper vom Esel 1:1000 verdünnt für SP-C-ELISA, in 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% BSA aufgetragen und 120 min bei RT inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen wiederum mit 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 0.5% Tween 20 entfernt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde wie bei den Western Blots die Avidin/Biotin-Peroxidase-Technik (AB-Komplex, Dako, Hamburg) eingesetzt. Dazu wurden ein Tropfen Avidinlösung und ein Tropfen biotinylierter Meerrettichperoxidaselösung in 5 ml PBS gegeben und 30 min lang äquilibriert. 200 µl einer Verdünnung aus einem Tropfen dieser Lösung mit 10 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% BSA (4 Tropfen /10 ml für SP-C-ELISA) wurden 120 min auf den Platten inkubiert, anschließend wurde wieder dreimal gewaschen.

Die enzymatische Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat (6)] (ABTS) als Substrat eingeleitet. Dazu wurden 20 mg ABTS und 10 µl 30% H₂O₂ in 30 ml Substratpuffer (60 mM Natriumacetat-Trihydrat, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat pH 4.2) gelöst und 200 µl dieser Lösung pro well pipettiert. Nach der Farbentwicklung (60 min RT) erfolgte die spektralphotometrische Auswertung bei 405 nm oder 450 nm. Die Standardkurven wurden durch rechnergestützte Cubic-Spline-Interpolation gewonnen.

3.2.10. Esteraseaktivitätsassay

Mittels eines photometrischen Assays wurde die Esteraseaktivität in BAL und Alveolarmakrophagen, die mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnen wurden, bestimmt. Als Referenzsubstanz diente hierbei kommerzielle Schweineleberesterase. Aus einer frisch angesetzten Stocklösung dieser Esterase (1 mg/ml) in 0.9%iger NaCl-Lösung wurde zur Erstellung einer Standardkurve eine serielle Verdünnungsreihe in Phosphatpuffer (100 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) hergestellt, deren Konzentrationen in der folgenden Tabelle (Tab. 7) wiedergegeben sind.

Als Substrate wurden zur Bestimmung der Esteraseaktivität p-Nitrophenylacetat (pNPA) und zur Bestimmung der Amidaseaktivität des selben Enzyms Butanilincain (Hostacain) verwendet, wobei die Freisetzung der entsprechenden Spaltprodukte spektralphotometrisch verfolgt wurde. Gemessen und aufgetragen wurden schließlich die Steigung der Absorptionsgeraden in Abhängigkeit der Enzymaktivität.

Tab. 7: Standardverdünnungsreihen Esteraseassay.

Standard [U/ml] (pNPA 0.5 µmol/ml)	Standard [U/ml] (Hostacain 5 µmol/ml)
0.08	0.8
0.04	0.4
0.02	0.2
0.01	0.1
λ _{max} pNPA = 405 nm	λ _{max} Hostacain = 285 nm

Probenvorbereitung

Zur Bestimmung der Esteraseaktivität in der Lavage wurden drei verschiedene BAL-Pools aufgetaut. Je 500 µl BAL wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 500 µl Puffer versetzt. Die Gefäße wurden dann zunächst 30 Minuten bei RT inkubiert.

Die zur Bestimmung der Esteraseaktivität in Alveolarmakrophagen benötigten Zellen wurden aus dem Sediment der bei 300 x g-zentrifugierten, frischen Lavage gewonnen. Die Makrophagen wurden nach der Isolation in einer Neubauerkammer gezählt. Ca. 6 Mio. Zellen werden in 600 µl 0.9% ige NaCl-Lösung aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem N₂ und wieder Auftauen lysiert. Nach Zentrifugation bei 14 000 rpm für 10 min erhielt man im Überstand das Zellysate, die sedimentierten Zellreste wurden verworfen. Die gleiche Anzahl Alveolarmakrophagen wurde ebenfalls in 600 µl 0.9% NaCl aufgenommen und als Zellsuspension eingesetzt.

Esteraseassay

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl (0.5 µmol) einer 20 mM Lösung von pNPA in Acetonitril bzw. 50 µl (5 µmol) einer Lösung von Hostacain in Na₂HPO₄-Puffer (0.25 M, pH 8.95) zu den vorinkubierten Proben gestartet. Die Messdauer betrug 2 Minuten. Aus der gemessenen Steigung wurde mit Hilfe der Standardkurve die Esteraseaktivität in den Proben bestimmt.

Sowohl bei den Standards, als auch bei den Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.3. Spezielle Arbeitsvorschriften

3.3.1. In vitro Konversion von Surfactantpräparationen auf natürlicher Basis

Kaninchen BAL wurde zur Gewinnung eines organischen Extraktes einer Trennung nach Bligh und Dyer (siehe Kap. 3.2.4.) unterzogen.

Für die in vitro Konversion wurde das während der Extraktion verlorene SP-A dem Extrakt mit einem Anteil von 2% ersetzt (bei einem PL-Gehalt des Konzentrats von etwa 8000 µg entsprechend 160 µg SP-A). Hierzu wurde dem wässrig suspendierten organischen Extrakt human rekombinantes SP-A in einem Volumen von 160 µl zugegeben. Das rekonstituierte BAL-Konzentrat wurde 20s mittels einer Ultraschallnadel homogenisiert und anschließend für 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 600 µl des Konzentrates mit in vitro Konversionspuffer auf ein Volumen von 60 ml verdünnt (PL-Gehalt 100 µg/ml) und in zwei 30 ml-Portionen aufgeteilt. Eine Portion wird mit 545 µg Schweineleberesterase (18 µg/ml, bzw. 1.8 U/ml) versetzt, gut geschüttelt und nochmals 45 min bei 37°C inkubiert. Beide Portionen wurden dann auf sechs 15 ml Kunststoffröhrchen zu je 5 ml verteilt.

Die Proben ergeben sich wie folgt:

3x	+ Esterase, 240 min in vitro Konversion
3x	- Esterase, 240 min in vitro Konversion
2x	+ Esterase, 0 min in vitro Konversion (nur Inkubation bei 37°C)
2x	- Esterase, 0 min in vitro Konversion (nur Inkubation bei 37°C)

Je drei Röhrchen gleicher Zusammensetzung wurden 240 min bei 37°C rotiert, zwei dienten als 0 min Kontrolle und das letzte zur Gesamt-PL-Bestimmung. Nach der in vitro Konversion wurden die Proben, einschließlich der Kontrollproben, 1h bei 48 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde mittels Phosphattest (siehe Kap. 3.2.5.) aus den Pellets der LSA-Gehalt bestimmt.

3.3.2. In vitro Konversion von synthetischen Surfactantpräparationen

3.3.2.1. In vitro Konversion eines synthetischen PL-Gemisches mit variablem SP-B-Gehalt

21 mg DPPC und 9 mg PG (7:3) wurden in 10 ml eines Gemisches von Methanol und Chloroform im Verhältnis 2:1 gelöst. Je 833 µl (2500 µg PL) dieser Lösung und je 25 µg SP-C (Kaninchen), gelöst in LH-60-Puffer, wurden in ein 45 ml Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckelverschluss (Firma Falcon, insgesamt 10 Stück) gegeben. Jeweils zwei dieser Kunststoffröhrchen wurden dann mit je 0 µg, 2.5 µg, 12.5 µg, 25 µg bzw. 50 µg SP-B (Kaninchen), gelöst in LH-60-Puffer, versetzt und im N₂-Strom getrocknet. Die Rückstände wurden in je 25 ml in vitro Konversionspuffer resuspendiert und die Suspensionen mittels Ultraschallnadel für 20s homogenisiert. Jedes Gefäß wurde nun mit 25 µg SP-A (human, rekombinant, Allel α1) und jeweils eines der doppelten Gefäße außerdem mit 450 µg Schweineleberesterase (18 µg/ml, bzw. 1.8 U/ml) versetzt. Es ergaben sich somit 10 Proben zu je 25 ml mit folgender Zusammensetzung:

2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/C, 0% SP-B , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/C, 0.1% SP-B , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/C, 0.5% SP-B , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/C, 1% SP-B , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/C, 2% SP-B , +/- Esterase

Die Proben wurden auf fünf 15 ml Kunststoffröhrchen zu je 5 ml verteilt. Je drei Gefäße gleicher Zusammensetzung wurden 240 min bei 37°C rotiert, eines diente als 0 min Kontrolle und das letzte zur Gesamt-PL-Bestimmung. Nach der in vitro Konversion wurden die Proben, einschließlich der Kontrollproben, 1h bei 48 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde mittels Phosphatetest aus den Pellets der LSA-Gehalt bestimmt.

3.3.2.2. In vitro Konversion eines synthetischen PL-Gemisches mit variablem SP-C-Gehalt

28 mg DPPC und 12 mg PG (7:3) wurden in 8 ml eines Gemisches von Methanol und Chloroform im Verhältnis 2:1 gelöst. Je 500 µl (2500 µg PL) dieser Lösung und je 25 µg SP-B (Kaninchen) gelöst in LH-60-Puffer wurden in ein 45 ml Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckelverschluss (Firma Falcon, insgesamt 10 Stück) gegeben. Jeweils zwei dieser Kunststoffröhrchen wurden dann mit je 0 µg, 2.5 µg, 12.5 µg, 25 µg bzw. 50 µg SP-C (Kaninchen) gelöst in LH-60-Puffer versetzt und im N₂-Strom getrocknet. Die Rückstände wurden in je 25 ml in vitro Konversionspuffer resuspendiert und die Suspensionen mittels Ultraschallnadel für 20s homogenisiert. Jedes Gefäß wurde nun mit 25 µg SP-A (human, rekombinant, Allel α1) und jeweils eines der doppelten Cups außerdem mit 450 µg Schweineleberesterase (18 µg/ml, bzw. 1.8 U/ml) versetzt. Es ergaben sich somit 10 Proben zu je 25 ml mit folgender Zusammensetzung:

2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/B, 0% SP-C , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/B, 0.1% SP-C , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/B, 0.5% SP-C , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/B, 1% SP-C , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-A/B, 2% SP-C , +/- Esterase

Die Proben wurden auf fünf 15 ml Kunststoffröhrchen zu je 5 ml verteilt. Je drei Gefäße gleicher Zusammensetzung wurden 240 min bei 37°C rotiert, eines diente als 0 min Kontrolle und das letzte zur Gesamt-PL-Bestimmung. Nach der in vitro Konversion wurden die Proben, einschließlich der Kontrollproben, 1h bei 48 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde mittels Phosphatetest aus den Pellets der LSA-Gehalt bestimmt.

3.3.2.3. In vitro Konversion eines synthetischen PL-Gemisches mit variablem SP-A-Gehalt

28 mg DPPC und 12 mg PG (7:3) wurden in 10 ml eines Gemisches von Methanol und Chloroform im Verhältnis 2:1 gelöst. Je 500 µl (2500 µg PL) dieser Lösung und je 25 µg SP-B/C (Kaninchen) gelöst in LH-60-Puffer wurden in ein 45 ml Kunststoffröhrchen

mit Schraubdeckelverschluss (Firma Falcon, insgesamt 10 Stück) gegeben und im N₂-Strom getrocknet. Die Rückstände wurden in je 25 ml in vitro Konversionspuffer resuspendiert und die Suspensionen mittels Ultraschallnadel für 20s homogenisiert. In jeweils zwei dieser Kunststoffröhrchen wurden dann mit je 0 µg, 2.5 µg, 12.5 µg, 25 µg bzw. 50 µg SP-A (human, rekombinant α 2) gegeben. Jeweils eines der doppelten Gefäße wurde nun mit 450 µg Schweineleberesterase (18 µg/ml, bzw. 1.8 U/ml) versetzt. Es ergaben sich somit 10 Proben zu je 25 ml mit folgender Zusammensetzung:

2x	100 µg/ml PL, 1% SP-B/C, 0% SP-A , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-B/C, 0.1% SP-A , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-B/C, 0.5% SP-A , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-B/C, 1% SP-A , +/- Esterase
2x	100 µg/ml PL, 1% SP-B/C, 2% SP-A , +/- Esterase

Die Proben wurden auf fünf 15 ml Kunststoffröhrchen zu je 5 ml verteilt. Je drei Gefäße gleicher Zusammensetzung wurden 240 min bei 37°C rotiert, eines diente als 0 min Kontrolle und das letzte zur Gesamt-PL-Bestimmung. Nach der in vitro Konversion wurden die Proben, einschließlich der Kontrollproben, 1h bei 48 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde mittels Phosphatetest aus den Pellets der LSA-Gehalt bestimmt.

3.3.3. In vitro Konversion von Kaninchen SP-B Dimer mit Schweineleberesterase

3 µg (bzw. 2 µg) des Surfactantprotein B wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß aus Kunststoff mit Schnappdeckelverschluss unter N₂-Strom getrocknet und der Rückstand in 20 µl 1-Propanol aufgenommen. Dazu wurden 930 µl in vitro Konversionspuffer und 50 µl (50 µg) einer frischen Lösung von 1 mg Schweineleberesterase in 1 ml NaCl gegeben. Als Kontrollproben wurden 3 µg (bzw. 2 µg) SP-B und 50 µg Esterase alleine eingesetzt. Alle Proben wurden bei 37°C über Nacht rotiert. Anschließend wurden die Proben lyophilisiert und auf ein SDS-PAGE aufgetragen (Schägger/Jagow, TG 16.5%). Die Färbung war eine Kombination aus Coomassie- und Silberfärbung (siehe Kap. 3.2.8.1., Tab.5).

3.3.3.1. In vitro Konversion von SP-B mit Schweineleberesterase und Bligh & Dyer-Trennung

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Reaktionsansätze und Versuchsdurchführung wie in Punkt 3.3.3. beschrieben. Anschließend wurde eine Extraktion nach Bligh & Dyer durchgeführt (siehe Kap. 3.2.4., Abb. 15). Die wässrigen Phasen wurden lyophilisiert.

Die Glasgefäße, in denen die Extraktion durchgeführt worden war, wurden mit je 1 ml 50%igen 1-Propanol gespült, die Spüllösungen wurden lyophilisiert.

Die Rückstände wurden zum Auftrag auf ein SDS-PAGE allesamt in je 20 µl Gelauftragspuffer aufgenommen.

Die 2 ml Reaktionsgefäße wurden ebenfalls mit je 20 µl Gelauftragspuffer gespült.

Zwei SDS-PAGEs wurden angefertigt. Auf das eine wurden die wässrigen Phasen und die CHCl₃-Phasen aufgetragen. Auf das andere wurden die Spüllösungen aus den Glasgefäßen und den Reaktionsgefäßen aufgetragen.

3.3.3.2. In vitro Konversion von SP-B mit Esterase und Reduktion mit DTT

Die Vorbereitung der Reaktionsansätze erfolgte wie in Punkt 3.3.3. beschrieben. Nach in vitro Konversion über Nacht wurden die Reaktionslösungen lyophilisiert. Eine Probe wurde mit regulärem Gelauftragspuffer aufgenommen, die andere mit Gelauftragspuffer, der zuvor mit Dithiothreitol (DTT) (3.2 mM) versetzt worden war. Ebenso wurden zwei Standards mit SP-B Dimer vorbereitet, einer reduzierend (mit DTT), der andere nicht-reduzierend. Die Proben wurden 30 min auf ca. 80°C erhitzt und schließlich auf ein SDS-PAGE aufgetragen.

3.3.3.3. Kopplung von Schweineleberesterase an Sepharose und In vitro Konversion von SP-B mit Sepharose-Esterase

Um eine schnelle und einfache Entfernung der Esterase aus den Reaktionsansätzen zu ermöglichen wurde diese in einer dreistufigen Reaktion an Lysin-Sepharose gebunden (siehe Abb. 16-18).

Abb. 16: Schritt 1. Lys-Sepharose – S-SMPB - Kopplung

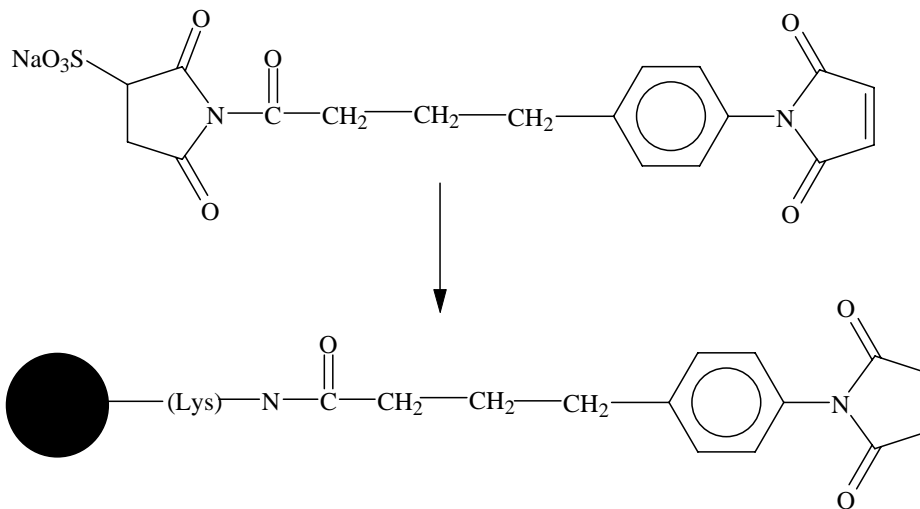


Abb. 17: Schritt 2. Esterase – Iminothiolan - Kopplung

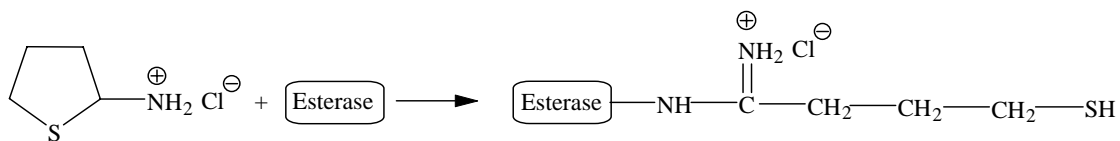
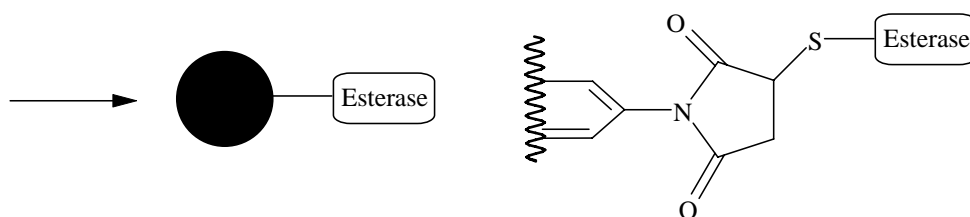


Abb. 18: Schritt 3. Kopplung von Esterase-SH an MB-Sepharose



12 ml Lysin-Sepharose (entsprechend ca. 84 μmol Lysin) in PBS pH 8.2 wurden mit 3-fach molarem Überschuß an Sulfosuccinimidylmaleidophenylbutyrat (S-SMPB) (252 μmol = 115.2 mg), gelöst in 15 ml PBS (pH 8.2) und Dimethylsulfoxid (DMSO), versetzt. Das Gemisch wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Das Gel wurde abgenutscht und mehrmals mit ca. 30 ml PBS (pH 6.8) gewaschen.

300 mg Schweineleberesterase (ca. 4×10^{-6} mol) gelöst in 11.25 ml PBS wurden mit einem 100-fachen molaren Überschuss Iminoethanol (405 μ mol = 57 mg) gelöst in 7.5 ml PBS versetzt und 45 min bei 37°C geschüttelt. Die Lösung wurde auf eine HiTrap Entsalzungssäule gegeben und mit PBS (pH 6.8) eluiert.

Das Gel und das Eluat wurden 22 h bei RT geschüttelt. Die fertige Sepharose-Esterase wird abgenutscht, ausgiebig mit in vitro Konversionspuffer (pH 7.4) gewaschen und schließlich in in vitro Konversionspuffer aufgeschlämmt aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für die in vitro Konversion wurden 10 μ g Kaninchen SP-B Dimer in einem 2 ml Reaktionsgefäß aus Kunststoff mit Schnappdeckelverschluss im N₂-Strom getrocknet. Der Rückstand wurde in 30 μ l 1-Propanol aufgenommen, mit 300 μ l der Sepharose-Esterase versetzt und mit in vitro Konversionspuffer auf ein Reaktionsvolumen von 1 ml aufgefüllt. Nach in vitro Konversion über Nacht bei 37°C wurde die Reaktionslösung über ein Glassäulchen mit Glasfaserfilter (Chromabond) unter leichtem Sog mittels einer Wasserstrahlpumpe abfiltriert. Das Filtrat wurde lyophilisiert. Der Filterkuchen wurde 3 mal mit je 500 μ l 1-Propanol gewaschen. Die Waschfraktion wurde im N₂-Strom getrocknet. Die Rückstände wurden in Gelauftragspuffer aufgenommen und auf ein SDS-PAGE aufgetragen.

3.3.3.4. In vitro Konversion von SP-B mit kommerziellen Esterase-Acrylbeads

3 x 15 μ g Kaninchen SP-B Dimer wurden im N₂-Strom getrocknet. Die Rückstände wurden in 500 μ l einer Suspension von DPPC / PG im Verhältnis 7:3 in einer NaCl/CaCl₂-Lösung wieder aufgenommen. 150 μ l der in (NH₄)₂SO₄ (2M, pH 8.0) aufgeschlämmten Esterase-Acrylbeads (Sigma) wurden mehrmals mit kleinen Portionen in vitro Konversionspuffer gewaschen. Zwei der Proben wurden mit je 75 μ l (10 U) der gewaschenen Esterase-Acrylbeads-Suspension versetzt, die letzte Probe diente als Kontrolle. Eine Probe mit Acrylbeads und die Kontrolle wurden 60 h bei 37°C rotiert. Die zweite Probe mit Acrylbeads wurde lediglich 60 h bei 37°C inkubiert. Alle Proben wurden anschließend komplett lyophilisiert. Die Rückstände wurden in je 75 μ l Gelauftragspuffer aufgenommen gut geschüttelt und anzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und auf das Gel aufgetragen. Die Acrylbeads

wurden nochmals mit 20 µl Gelauftragungspuffer gewaschen und anzentrifugiert. der Überstand wurde wiederum gewaschen und in die zugehörige Geltasche pipettiert. Auf die letzte Bahn wurden zur Kontrolle ebenfalls 75 µl Acrylbeads alleine aufgetragen. Durch kombinierte Coomassie-Silber-Färbung (siehe Kap. 3.2.8.1., Tab. 5) wurden nach dem Lauf die Banden sichtbar gemacht.

3.3.3.5. In vitro Konversion von SP-B für die Sequenzierung aus dem Western Blot

2 x 50 µg Kaninchen SP-B Dimer wurden in 2 ml Eppendorfcups im N₂-Strom getrocknet. Einer der Rückstände wurden in 30 µl 1-Propanol aufgenommen und mit 30 µl in vitro Konversionspuffer und 90 µl Sepharose-Esterase versetzt.

Der andere Rückstand wurde in µl 50%igem 1-Propanol aufgenommen und mit 1000 µl einer Suspension von DPPC:PG im Verhältnis 7:3 in CaCl₂/NaCl-Lösung versetzt.

250 µl (33.3 U) der Esterase-Acrylbeads wurden mehrmals mit kleinen Portionen in vitro Konversionspuffer gewaschen. Die gewaschenen Beads wurden zu der Proteinsuspension pipettiert.

Beide Proben wurden für 72 h bei 37°C rotiert. Der Reaktionsansatz mit Sepharose-Esterase wurde abfiltriert, der Filterkuchen dreimal mit 500 µl 1-Propanol gewaschen und die Waschfraktion getrocknet. Der Rückstand wurde in 20 µl Gelauftragungspuffer aufgenommen und auf ein SDS-PAGE aufgetragen.

Der Reaktionsansatz mit Esterase-Acrylbeads wurde lyophilisiert, der Rückstand zweimal in 50 µl Gelauftragungspuffer aufgenommen und anzentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils vorsichtig abpipettiert, vereinigt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

Nach dem Lauf wurde das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran anschließend kurz mit Coomassie Blue gefärbt. Das Gel wurde mit einer Kombination aus Coomassie- und Silberfärbung gefärbt.

3.3.4. Schütteln von SP-B mit Sepharose-Esterase, HPLC (C₈-Säule, Porengröße 100 Å) und SDS-PAGE

50 µg Kaninchen SP-B Dimer wurden in einem 2 ml Eppendorfcup im N₂-Strom getrocknet. Der Rückstand wird in 30 µl 1-Propanol aufgenommen und mit 100 µl Sepharose-Esterase versetzt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei RT auf einem Schüttelbrett geschüttelt. Nach Filtration wurde der Sepharose-Filterkuchen portionsweise nun mit 10 ml LH-60-Puffer gewaschen, da sich dieser leichter abblasen lässt als Propanol, und die Waschlösung in einem Reagenzglas aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde im N₂-Strom aus der Waschfraktion entfernt, wobei zwischendurch in ein 2 ml Eppendorfcup umgefüllt wurde. Der Rückstand wurde zur Aufgabe auf die HPLC in 200 µl Ethanol aufgenommen. Die Lösung wurde auf die HPLC-Säule aufgespritzt und die Fraktionen wie oben beschrieben eluiert. Es wurden durchgehend 2 ml-Fraktionen in 2 ml Eppendorfcups gesammelt. Die Peakfraktionen wurden anhand des UV-Spektren bei 220 nm und 279 nm identifiziert und vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden lyophilisiert und auf ein SDS-Page aufgetragen.

3.4. Statistik

Eine statistische Auswertung erfolgte aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der aus natürlichen Quellen aufgereinigten oder rekombinant hergestellten Proteine und der somit insgesamt geringen n-Anzahl nur für die Experimente zu 4.1.1., bei denen 9 Messungen pro Gruppe durchgeführt wurden. Alle anderen Untersuchungen wurden mit einem Stichprobenumfang von mindestens $n=3$ durchgeführt.

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (Mittelwert \pm SD). Die statistische Analyse auf Unterschiede zwischen voneinander unabhängigen Datensätzen erfolgte mit Hilfe von SPSS (Vers. 9.0, SPSS GmbH, München). Dazu wurden zunächst für jeden einzelnen Parameter per Kruskal-Wallis-H-Test die prinzipiellen Signifikanzunterschiede innerhalb der Kollektive ermittelt (einfaktorielle Rangvarianzanalyse), gefolgt von der Durchführung eines non-parametrischen Testes für jeweils zwei Kollektive (Mann-Whitney-U-Test). Das Signifikanzniveau wurde bei $p<0,05$ festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Dargestellt sind die Signifikanzniveaus im Text und in den Abbildungen jeweils mit * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$); *** ($p<0,001$).

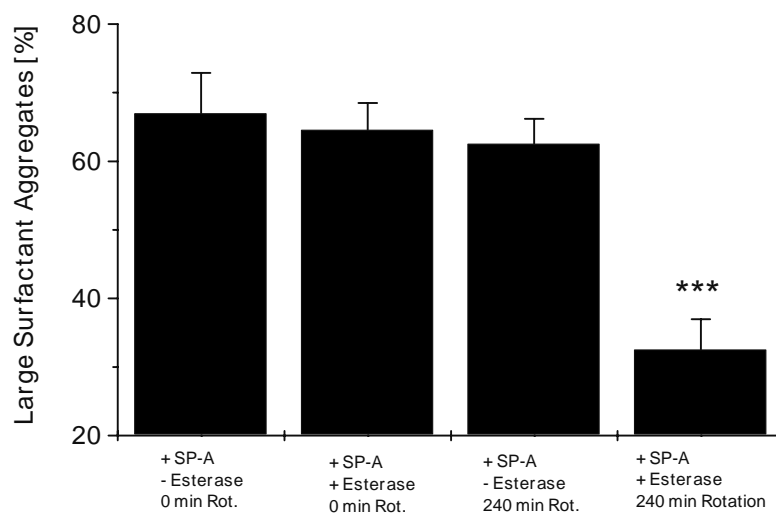
4. Ergebnisse

4.1. Einfluss von Esteraseaktivität und Surfactantproteinprofil auf die Konversion

4.1.1. Einfluss von Schweineleberesterase auf die in vitro Konversion von Surfactantpräparationen auf natürlicher Basis

Mit Hilfe eines einfachen Experimentes konnte gezeigt werden, dass eine Esterase tatsächlich in der Lage ist, die Konversion von LSA zu SSA zu induzieren. Kaninchen BAL diente hierbei als Ausgangsmaterial zur Gewinnung enzymfreier Surfactantpräparationen auf natürlicher Basis. Durch organische Extraktion der Lavage wurde ein Konzentrat erhalten, das lediglich die hydrophoben Bestandteile, wie PL und die hydrophoben Surfactantproteine B und C enthielt. Das hydrophile Surfactantprotein A ist für die Ausbildung der Gitterstruktur des tubulären Myelins verantwortlich [16], das zusammen mit den lamellar bodies die LSA repräsentiert und somit zur Rekonstitution des Extraktes notwendig ist. Nach Rekonstitution mit SP-A wurde eine in vitro Konversion in An- bzw. Abwesenheit von Schweineleberesterase durchgeführt. Zur Beurteilung der Konversion wurde anschließend der LSA-Gehalt in den Proben bestimmt. Nicht rotierte Proben dienten als Kontrolle.

Abb.19: In vitro Konversion von Kaninchen BAL (org. Extrakt) + SP-A +/- Esterase



Das Blockdiagramm (Abb. 19) fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen zusammen (insgesamt n=9 pro Gruppe). Aus dem Diagramm ist zu entnehmen, dass eine deutliche Konversion des Extraktes, die der Konversion von natürlichem Surfactant entspricht, nur bei Anwesenheit der Esterase erreicht wurde. Dagegen führte die in vitro Konversion des Extraktes ohne Esterase nur zu sehr geringgradiger Konversion.

4.1.2. Einfluss des Gehalts an Apoproteinen in synthetischen Surfactantpräparationen auf die Konversion

Die in vitro Konversion eines synthetischen, der natürlichen Zusammensetzung annähernd entsprechenden Phospholipidgemisches (PLX), dem alle Apoproteine vorher zugesetzt worden waren, führte, wie unter 4.1.1. beschrieben, zu vergleichbaren Ergebnissen. Zudem zeigte sich eine Abhängigkeit des Konversionsgrades vom SP-B-Gehalt der Surfactantpräparationen. Die Variation des Gehaltes der Surfactantproteine A und C beeinflusste den Konversionsgrad dagegen kaum. Um dies zu zeigen wurden wässrige Suspensionen verwendet, die ein Gemisch von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Phosphatidylglycerol (PG) im Massenverhältnis von 7:3 enthielten. Die Surfactantproteine A, B und C wurden entsprechend den gewünschten Gewichtsanteilen bezogen auf den Phospholipidgehalt zugesetzt. Dabei wurde der Gehalt des zu untersuchenden Proteins von 0% - 2% gesteigert, während der Gehalt der beiden anderen Proteine bei konstant 1% gehalten wurde. Die in vitro Konversion wurde wiederum in An- bzw. Abwesenheit von Schweineleberesterase durchgeführt und anschließend der LSA-Gehalt bestimmt.

Abb.20: In vitro Konversion von PLX +/- Esterase, variabler SP-B-Gehalt
(+ je 1% SP-A/C)

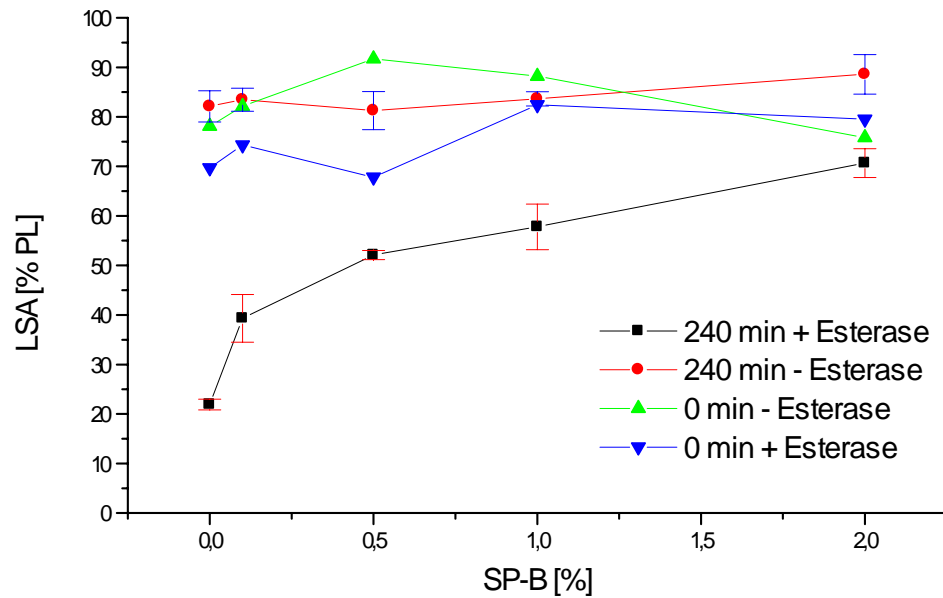


Abb.21: In vitro Konversion von PLX +/- Esterase, variabler SP-C-Gehalt
(+ je 1% SP-A/B)

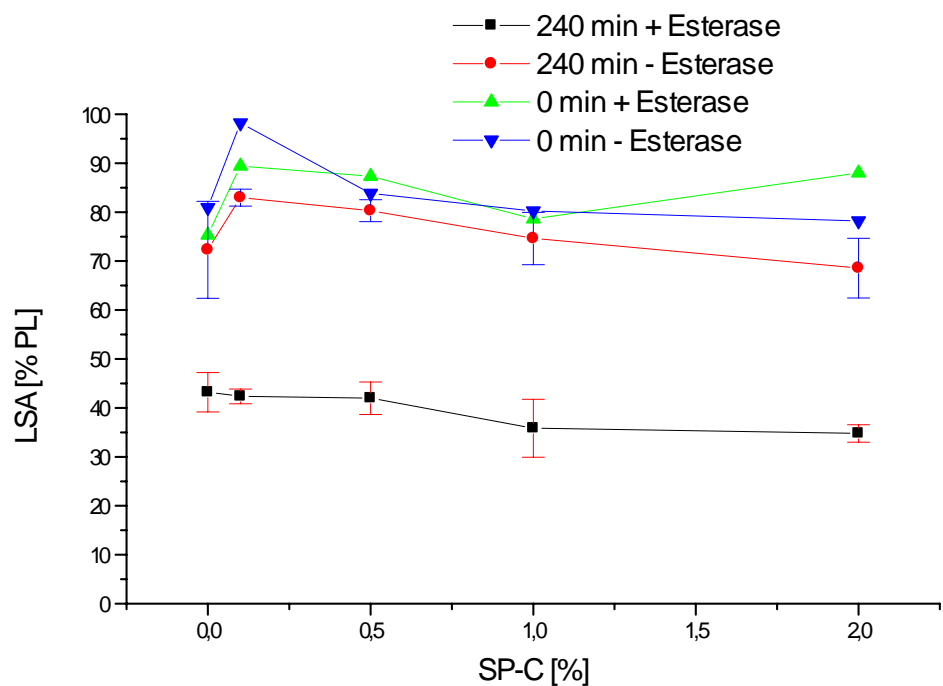
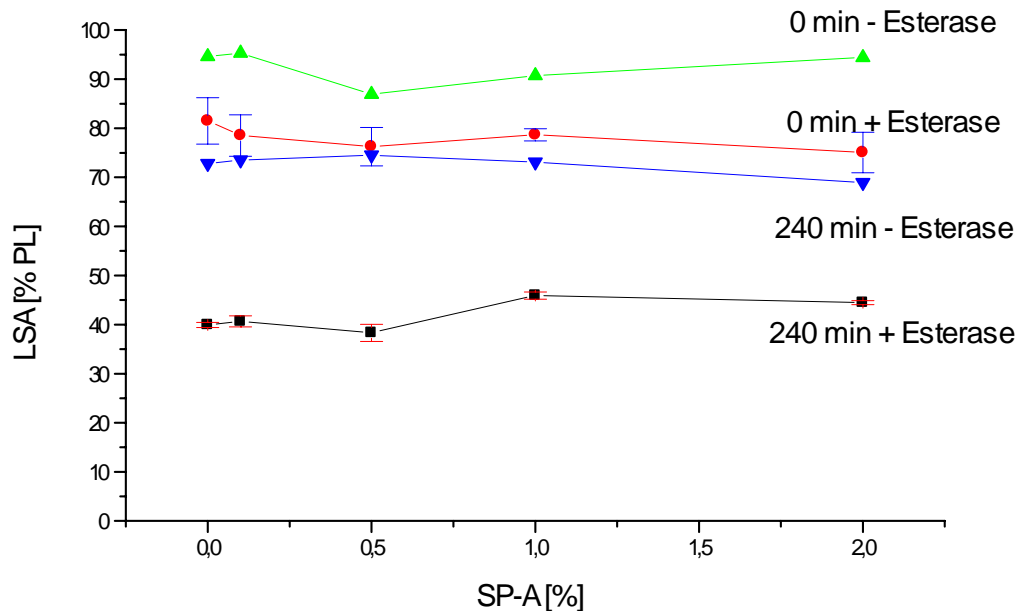


Abb.22: In vitro Konversion von PLX +/- Esterase, variabler SP-A-Gehalt
(+ je 1% SP-B/C)



Dargestellt ist jeweils der relative Gehalt der large surfactant aggregates am Ende des Versuches in Abhängigkeit des relativen Gehaltes an SP-B.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bestätigten erneut die Abhängigkeit der Surfactantkonversion von der Gegenwart einer Esterase.

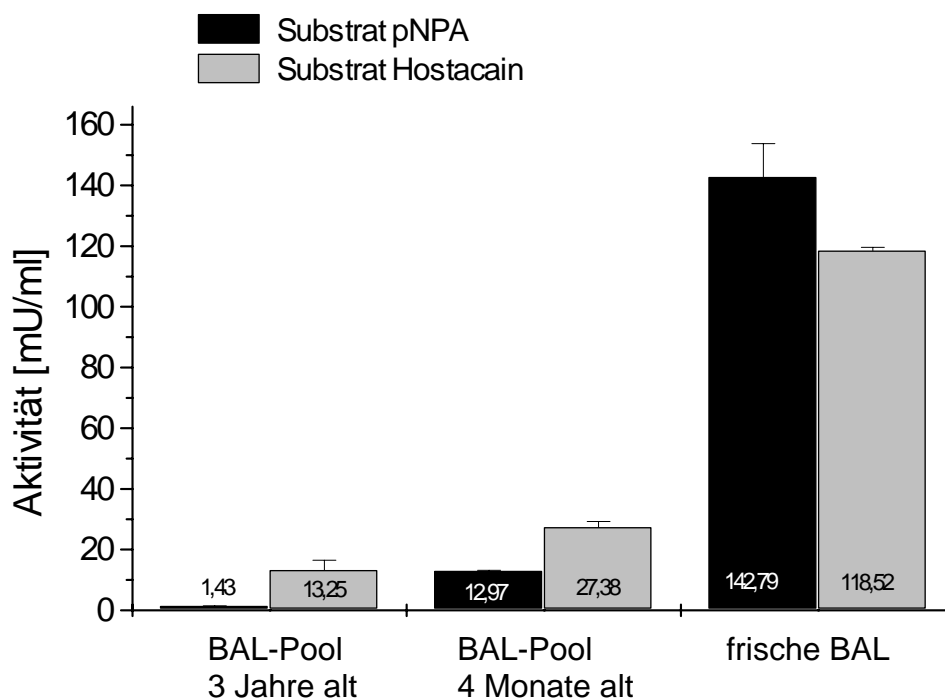
Ein hoher SP-B-Anteil schützte offenbar vor Konversion, während bei sinkendem SP-B-Gehalt eine Steigerung des Konversionsgrades beobachtet wurde. Von geringerer Bedeutung schienen diesbezüglich die beiden anderen Apoproteine zu sein. Die Variation des SP-C- bzw. SP-A-Gehaltes beeinflusste den Konversionsgrad nicht wesentlich.

4.2. Nachweis von Esteraseaktivität in nativer BAL und Alveolarmakrophagen

4.2.1. Vergleich der Esteraseaktivität in verschiedenen BAL Pools

Mit Hilfe eines Enzymaktivitätsassays konnte Esteraseaktivität in verschiedenen BAL-Pools nachgewiesen werden. Für diesen Assay wurden als Substrate p-Nitrophenylacetat zur Erfassung der Esterasefunktion und Butanilincain (Hostacain) zur Erfassung der Amidasefunktion verwendet. Als Standardenzym wurde kommerzielle Schweineleberesterase verwendet. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen sind in Form eines Blockdiagrammes (Abb. 23) dargestellt.

Abb. 23: Esterase- bzw. Amidaseaktivität in diversen Lavagen



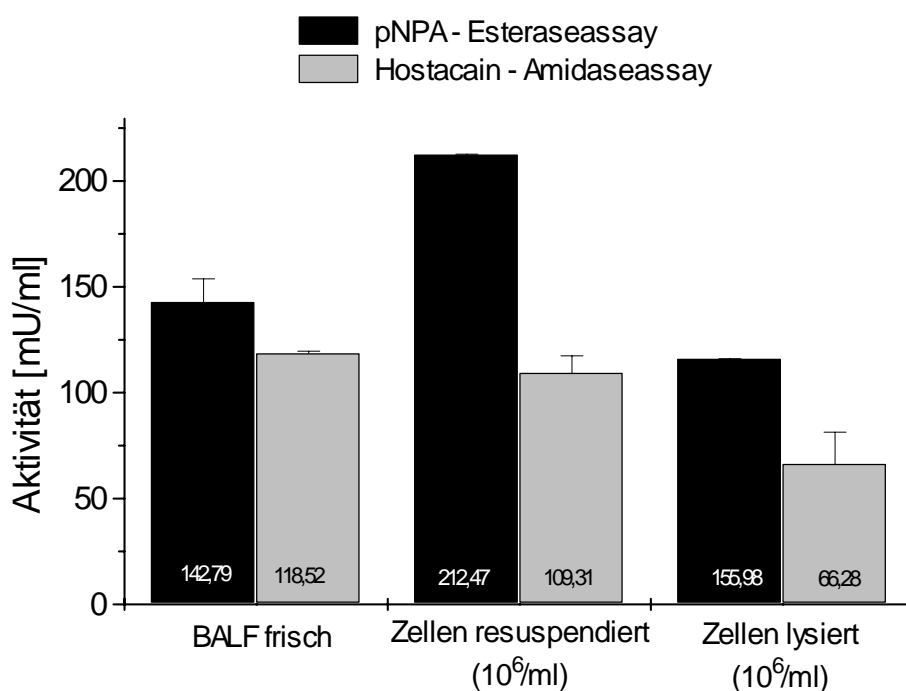
Demnach waren sowohl Esterase- wie Amidaseaktivität in sämtlichen BAL-Pools nachweisbar, allerdings nahm die Aktivität bei längerer Lagerung (-20°C) deutlich ab. Die höchste Enzymaktivität fand sich in frischer Lavage, die nicht vor Gebrauch tiefgekühlt worden war.

4.2.2. Nachweis von Esteraseaktivität in Alveolarmakrophagen und Zelllysaten

Beim Gewinnen von Surfactant durch bronchoalveoläre Lavage wurden auch Alveolarmakrophagen, gewonnen. Die Zellen wurden unmittelbar nach dem Lavagieren durch Zentrifugation bei 300 x g für 10 min abgetrennt und in der Regel verworfen.

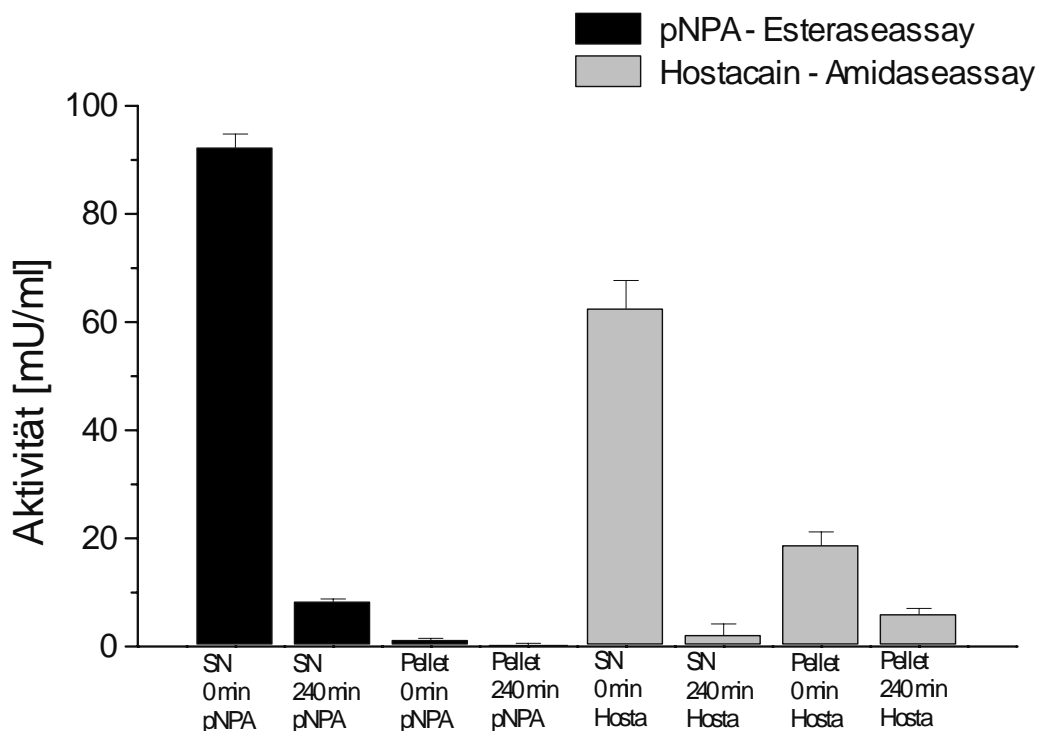
Zur Überprüfung der Frage ob Alveolarmakrophagen zur Surfactantkonversion durch Expression einer Esterase beitragen können, wurden frisch isolierte Alveolarmakrophagen auf Ihr Esterase- bzw. Amidaseaktivität hin untersucht (siehe Abb. 24-25).

Abb. 24: Esterase- und Amidaseaktivität in BAL und Zellbestandteilen.



In den Zelllysaten und den Zellsuspensionen war, wie in frischem, zelldepletiertem BAL-Fluid (BALF), Esteraseaktivität nachweisbar.

Abb. 25: Esterase- und Amidaseaktivitätstest Subfraktionen frischer BAL.



Die höchste Enzymaktivität fand sich bei beiden Assays im Überstand, vor allem hinsichtlich der Esteraseaktivität. Beim Esterase-Assay wurde im Pellet nur sehr geringe Aktivität gefunden, beim Amidase-Essay ließ sich dort mehr Aktivität nachweisen. Nach der in vitro Konversion war die verbliebene Enzymaktivität in allen Subfraktionen und in beiden Essays deutlich reduziert (Abb. 25).

In BAL war hohe Esterase- und Amidaseaktivität nachweisbar, die sich nach Zentrifugation bei 48 000 x g vor allem im Überstand konzentrierte. Die Enzymaktivität in BAL nahm jedoch auch durch in vitro Konversion stark ab.

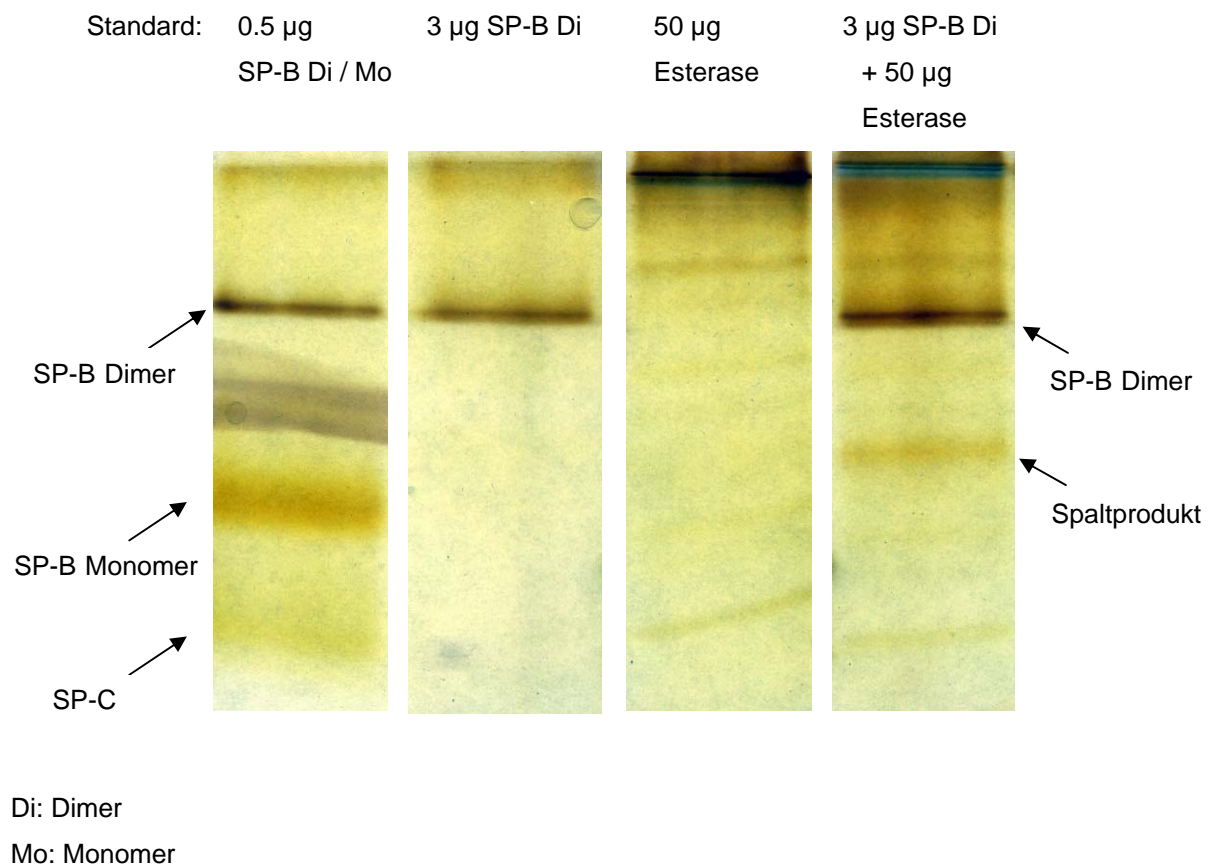
Suspensionen von Alveolarmakrophagen und Lösungen von lysierten Alveolarmakrophagen wiesen ebenfalls Esterase- und Amidaseaktivität auf.

4.3. Umsetzung von isoliertem SP-B mit Schweineleberesterase, Isolierung des Spaltproduktes und Sequenzierung

4.3.1 In vitro Konversion von SP-B mit Schweineleberesterase

Die Umsetzung von isoliertem Kaninchen SP-B Dimer mit Schweineleberesterase in wässrigem Millieu bei pH 7.4 und in Anwesenheit von Kalzium bei 37°C (entspr. 3.3.3.) führte zur Spaltung des Surfactantproteins. Dementsprechend war im SDS-PAGE nach Aufgabe der Reaktionsansätze eine neue Bande in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 11-14 kDa nachweisbar (Abb 26).

Abb.26: In vitro Konversion von SP-B + Schweineleberesterase.



Es war eine neue Bande im Reaktionsansatz mit Esterase zu erkennen, die etwas oberhalb des SP-B Monomers lief. In weiteren analogen Experimenten war diese neue Bande im SDS-PAGE reproduzierbar.

Als weiteres Nachweisverfahren wurde von einem dieser SDS-PAGEs auch ein Western Blot, mit antikörpervermittelter Markierung der Proteinbanden mit Meerettichperoxidase und anschließender Farbreaktion mit Diaminobenzidin als Substrat, durchgeführt. Hierbei wurde die Spaltproduktbande im Gegensatz zum SP-B Dimer jedoch nicht sichtbar. Demnach hatte der verwendete SP-B Dimer-Antikörper offenbar nicht an das Spaltprodukt gebunden.

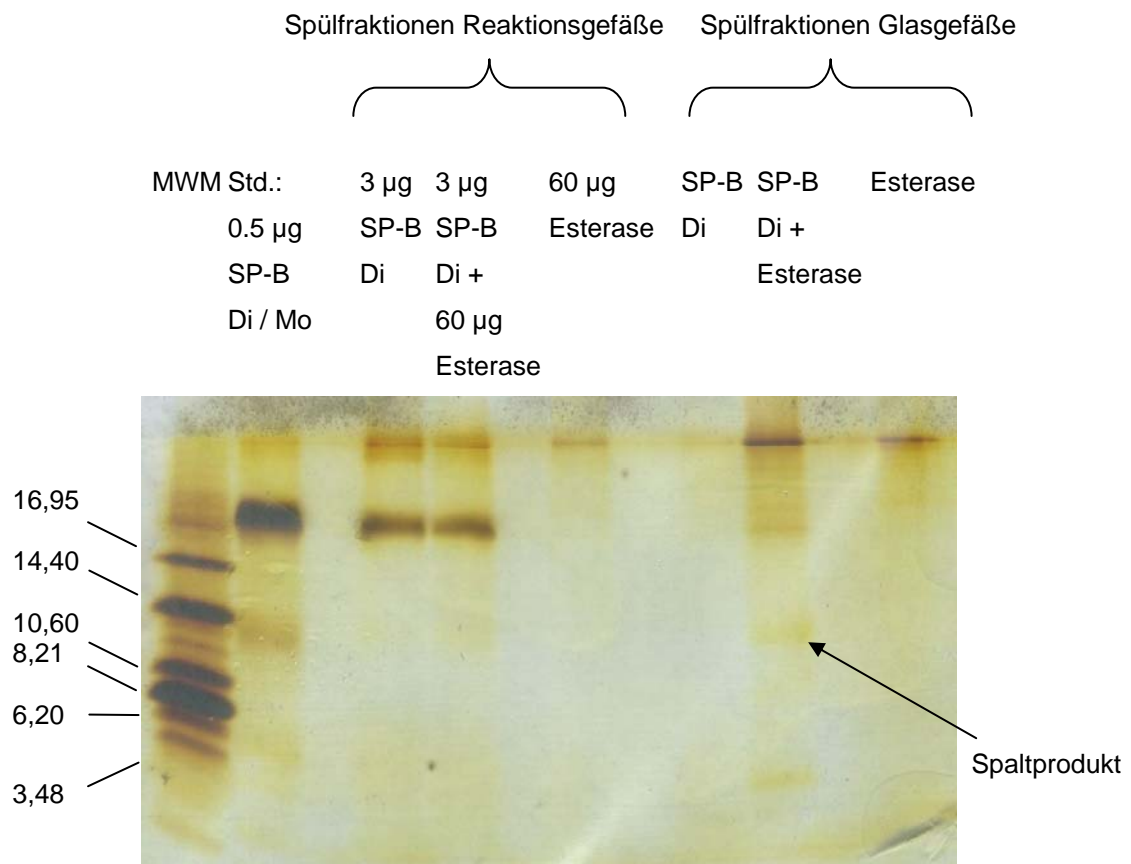
4.3.2. Organische Extraktion der Reaktionsansätze

Es wurde aus vergleichbaren Ansätzen zu 4.3.1. dann versucht, das Spaltprodukt aus der wässrigen Reaktionslösung zu isolieren. Hierzu wurde eine Extraktion nach Bligh und Dyer durchgeführt, bei der die Reaktionslösungen nach der *in vitro* Konversion in die für die Trennung vorbereiteten Glasgefäße gegeben und wie in Kap. 3.2.4. beschrieben extrahiert wurden. Die Glasgefäße, in denen die Trennung durchgeführt worden war, wurden nach Gebrauch mit jeweils 2 ml 50 % igem 1-Propanol gespült. Die Spülfractionen wurden lyophilisiert und die Rückstände in jeweils 20 µl Gelauftragspuffer wiederaufgenommen und als separate Probe geführt. Auch die ursprünglichen Reaktionsgefäße aus Kunststoff wurden mit jeweils 30 µl Gelauftragspuffer gespült. Die Spülfractionen wurden alle auf ein SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 27).

Schließlich wurden auch die Chloroformphasen und die wässrigen Phasen aus der Bligh und Dyer Trennung separat getrocknet, die Rückstände ebenfalls in jeweils 20 µl Gelauftragspuffer aufgenommen und auf ein weiteres SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 28).

Wie aus Abb. 27 und 28 ersichtlich, ist in geringem Umfang eine Adhäsion des SP-B an die Wandung der Reaktionsgefäße des *in vitro* Konversionsansatzes zu beobachten gewesen (Abb. 27 "Spülfraction Reaktionsgefäße"). Nach Zugabe der Esterase ließ sich das Spaltprodukt nur in der Spülfraction der für die Bligh und Dyer Extraktion benutzten Glasgefäße nachweisen und nicht in der wässrigen oder der organischen Phase (Abb. 28).

Trennung nach Bligh und Dyer. Spülfractionen.



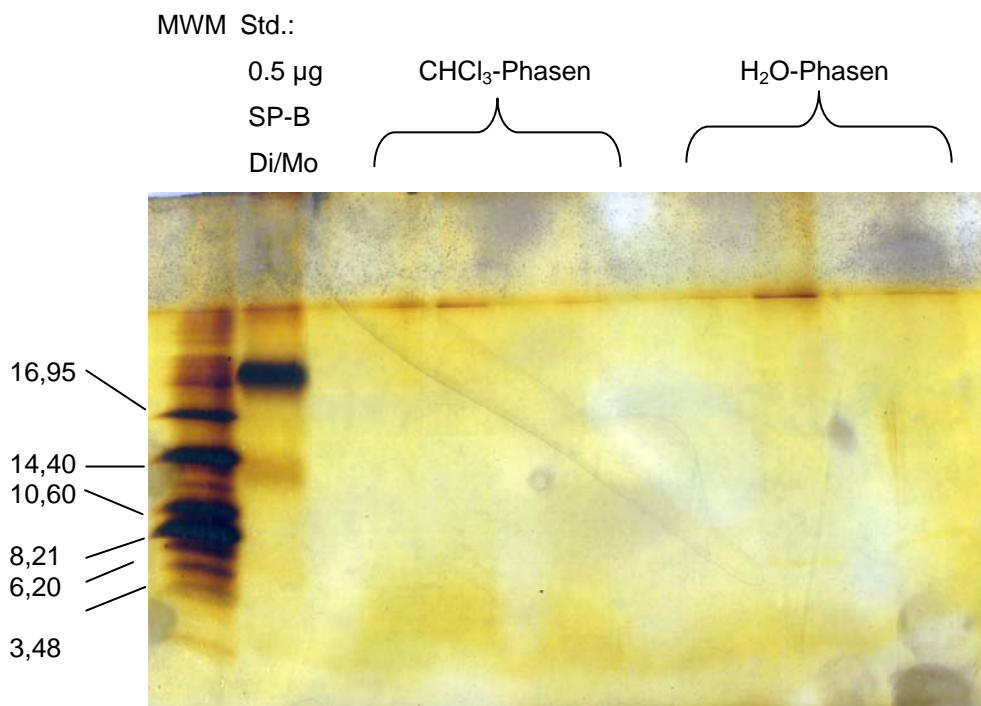
MWM: Molekulargewichtsmarker [kDa]

Std.: Standard

Di: Dimer

Mo: Monomer

Abb. 28: In vitro Konversion SP-B + Schweineleberesterase mit anschließender Trennung nach Bligh und Dyer. Trennphasen (Bahnenbelegung wie oben)



MWM: Molekulargewichtsmarker [kDa]

Std.: Standard

Di: Dimer

Mo: Monomer

4.3.3. In vitro Konversion von SP-B mit Sepharose-Esterase bzw. Esterase-Acrylbeads

Die Heterogenität der verwendeten Schweineleberesterase stellte sich als Problem heraus, da sich bei der Aufgabe von mehr als 60 µg des Enzyms eine Vielzahl an Banden im SDS-PAGE zeigte und somit eine eindeutige Zuordnung zum Enzym oder zum Spaltprodukt erschwert war. Daher wurde die Esterase in einer Kopplungsreaktion kovalent an Sepharose gebunden.

Hierzu mußte zunächst eine reaktive Gruppe wie z.B. Sulfosuccinimidylmaleidophenylbutyrat (S-SMPB) in die Lysin-Sepharose eingeführt

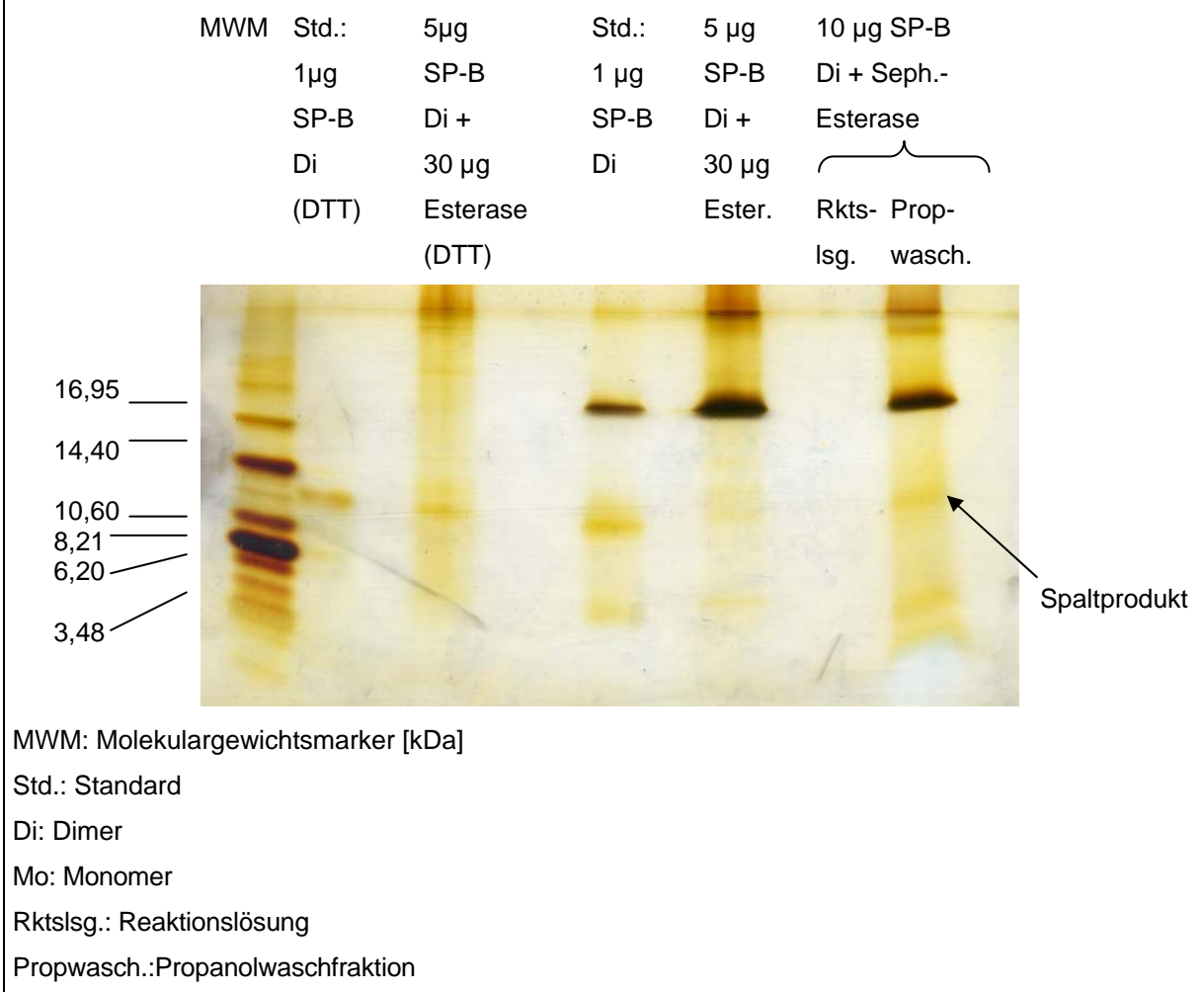
werden. Der zweite Schritt bestand in der Einführung einer SH-Gruppe in die Esterase. Schließlich wurde die sulfhydrierte Esterase an die Maleidophenylbutyrat-Sephrose gekoppelt.

Die Durchführung der in vitro Konversion erfolgte wie oben beschrieben. Das Enzym konnte nach Beendigung der Reaktion bequem durch Filtration aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Da ein großer Teil des SP-B in wässriger Lösung an die Sepharose bindet, wurde der Filterkuchen mehrmals mit kleinen Portionen 1-Propanol gewaschen. Das Filtrat und die Waschfraktionen wurden getrennt in 2 ml Eppendorfcups aufgefangen, lyophilisiert und auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Die schon zuvor als Spaltprodukt identifizierte Bande war erneut in der Propanolwaschfraktion zu sehen, in der filtrierte Reaktionslösung war dagegen kein Protein enthalten. Störbanden der Esterase fehlten.

4.3.4. In vitro Konversion von SP-B mit Esterase und Reduktion mit DTT

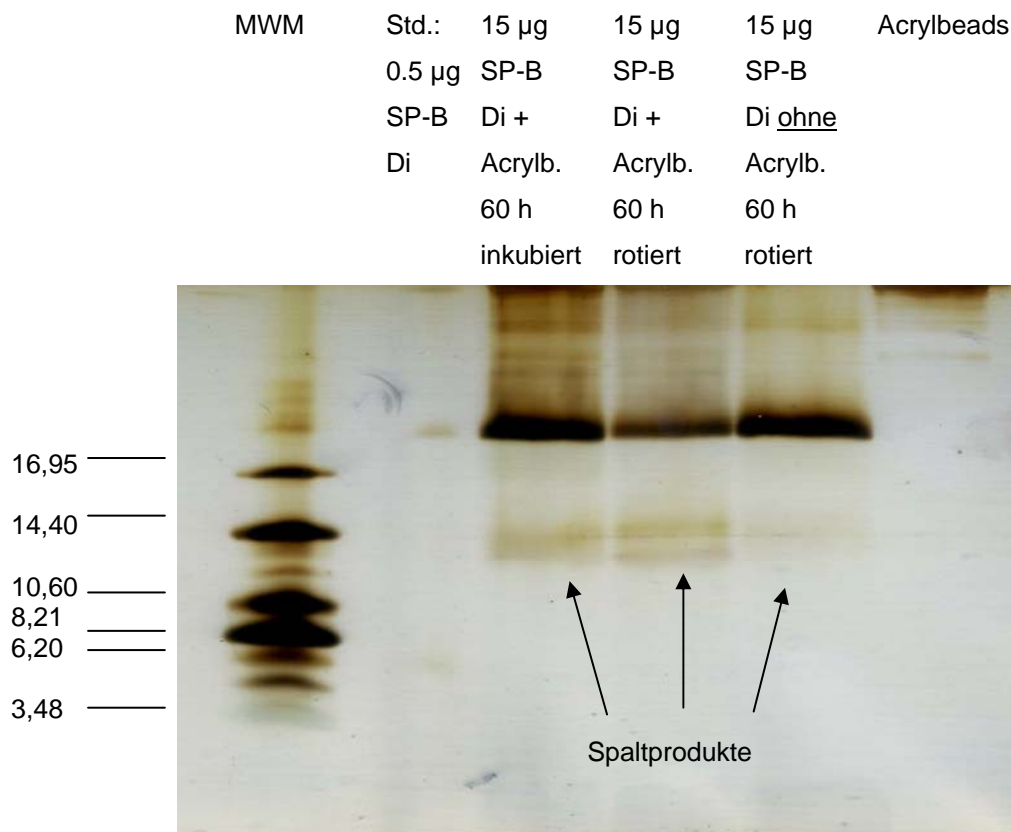
Bislang war aus den SDS-PAGEs nicht eindeutig hervorgegangen, ob das Spaltprodukt mit dem Monomer des SP-B identisch oder von diesem verschieden ist. Um die Zuordnung zu erleichtern, wurden die Reaktionsproben einer parallel durchgeführten in vitro Konversion von SP-B mit Schweineleberesterase unter reduzierenden Bedingungen mit Dithiothreitol (DTT) ebenfalls auf das SDS-PAGE aufgetragen. War das Spaltprodukt nicht identisch mit dem SP-B Monomer, so sollten außer der Bande des Monomer eine oder mehrere Banden des Spaltproduktes sichtbar sein. Enthielt das Spaltprodukt Disulfidbrücken, so würden diese durch die Reduktion gespalten. In diesem Fall wären als weitere Spaltprodukte SP-B Monomer und ein zusätzliches kleines SP-B-Fragment zu erwarten gewesen. Die Monomerbande aus der Reduktion des nicht umgesetzten SP-B war deutlich zu sehen, zusätzliche Banden waren fraglich (siehe Abb. 29). Die eindeutige Zuordnung des Spaltproduktes war somit noch nicht möglich.

Abb.29: In vitro Konversion SP-B + Schweineleberesterase (z. T. reduzierend mit DTT) bzw. + Sephareose-Esterase.



Um auszuschließen, dass die selbstgekoppelte Sephareose-Esterase noch Verunreinigungen enthielt, die möglicherweise durch das Waschen des Filterkuchens mit Propanol herausgelöst worden waren, wurde zum Vergleich ein Reaktionsansatz mit einer kommerziellen, an Acrylkügelchen (Acrylbeads) gekoppelten Schweineleberesterase vorbereitet (siehe Abb.30).

Abb. 30: In vitro Konversion SP-B + Esterase-Acrylbeads.



MWM: Molekulargewichtsmarker [kDa]

Std.: Standard

Di: Dimer

Mo: Monomer

Acrylb.: Acrylbeads

Auch hier wurde die Spaltproduktbande an erwarteter Stelle sichtbar. Die Spaltung erfolgte offenbar auch in der nicht rotierten Probe. Verunreinigungen durch die gekoppelte Esterase traten nicht auf.

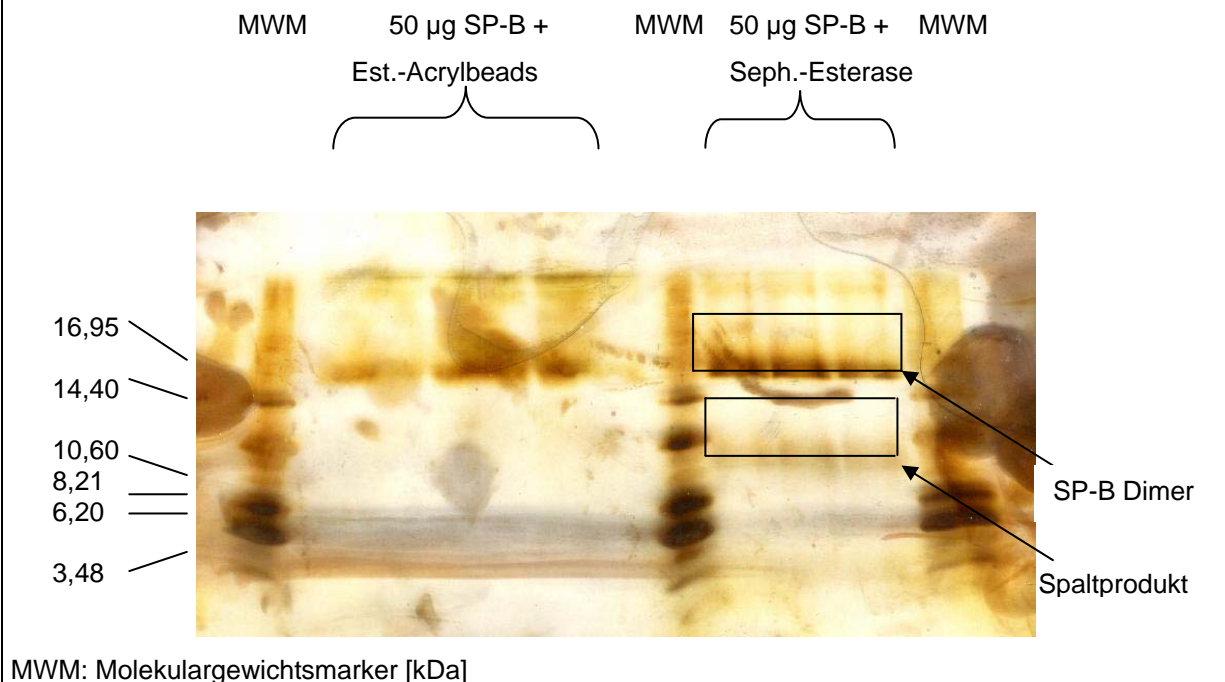
4.3.5. N-terminale Sequenzierung des Spaltproduktes

Kaninchen SP-B wurde mit Esterase-Acrylbeads bzw. Sepharose-Esterase über Nacht bei 37°C rotiert und wie bereits beschrieben die Sepharose-Esterase abgetrennt und gewaschen. Die Waschfraktion wurde auf ein SDS-PAGE

aufgetragen und die Proteinbanden nach Beendigung des Laufs auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde nach dem Blotten mit Coomassie angefärbt. Nach dem Transfer wurde das Gel gefärbt, um die Lokalisation der Banden im Blot zu erleichtern. Da die Spaltproduktbande im Falle der Umsetzung mit Esterase-Acrylbeads im Gel nicht ausreichend anfärbbar war, erfolgte die Sequenzierung lediglich mit den Banden aus dem Reaktionsansatz mit Sepharose-Esterase.

Das Ergebnis der Sequenzierung der Banden des ungespaltenen SP-B entsprach der bekannten Sequenz von Kaninchen SP-B Dimer. Die Sequenzierung von 26 Aminosäuren der als Spaltprodukt identifizierten Proteinbanden vom N-Terminus her ergab volle Übereinstimmung mit dem SP-B. Eine vollständige Sequenzierung des Spaltproduktes war mit der verwendeten Methode des Edman-Abbaus nicht möglich. Somit war das C-terminale Ende des Spaltproteins und damit die Spaltstelle im SP-B Dimer noch nicht zu ermitteln.

Abb. 31: In vitro Konversion von SP-B Dimer mit Esterase-Acrylbeads bzw. Sepharose-Esterase. Gelfärbung post Western Blot.



Tab. 8: N-terminale Sequenz von Kaninchen SP-B Dimer und Spaltprodukt bis Aminosäure 26.

N-Term.	SP-B	Spaltpr.	N-Term.	SP-B	Spaltpr.	N-Term.	SP-B	Spaltpr.
1	F	F (Phe)	11	C	C (Cys)	21	M	M (Met)
2	P	P (Pro)	12	R	R (Arg)	22	I	I (Ile)
3	I	I (Ile)	13	T	T (Tyr)	23	P	P (Pro)
4	P	P (Pro)	14	L	L (Leu)	24	K	K (Lys)
5	L	L (Leu)	15	L	L (Leu)	25	G	G (Gly)
6	P	P (Pro)	16	K	K (Lys)	26	V	V (Val)
7	L	L (Leu)	17	R	R (Arg)			
8	C	C (Cys)	18	I	I (Ile)			
9	W	W (Trp)	19	Q	Q (Gln)			
10	L	L (Leu)	20	A	A (Ala)			

4.4. HPLC-Läufe von Reaktionsansätzen von SP-B mit Sepharose-Esterase

4.4.1. reversed phase-HPLC mit einer C₈-Säule, 100 Å

Da die Extraktion des Spaltproduktes mit Methanol/Chloroform nicht gelungen war, wurde nun die Auftrennung mit der HPLC durchgeführt. H. Büniger et al. [243] verwendeten Sephadex LH-60 als stationäre Phase für die Auftrennung der hydrophoben Surfactantproteine mittels HPLC. Sepharose ist jedoch nicht druckstabil, so dass die Peaks stark verbreitert waren. Statt einer Größenausschlusschromatographie bot sich daher die reversed phase Chromatographie [257] unter Verwendung eines C₈-Materials mit geeigneter Porengröße als stationärer Phase und eines Lösungsmittelgradienten mit steigender Hydrophobizität an. Mit einer Säule vom Typ Zorbax Eclipse XDB-C₈ 5µm 4.6 x 150 mm, Porengröße 100 Å und einem linearen Lösungsmittelgradienten, beginnend mit 40% Methanol und nach 40 min endend mit 100% Isopropanol bei einem Flow von 1 ml/min, wurden die Reaktionsansätze aufgetrennt.

Zuvor durchgeführte Testläufe unter diesen chromatographischen Bedingungen mit aufgereinigtem Kaninchen SP-B Dimer hatten eine Retentionszeit von ca. 21 min ergeben. Außer diesem für das SP-B charakteristische Signal bei 21.6 min (54.0% Isopropanol) trat bei einer Detektionswellenlänge von 279 nm nur ein weiteres Signal bei ca. 29.7 min (74.25% Isopropanol) auf.

Die Signale in den Chromatogrammen waren im Verhältnis zur relativ großen Menge von 30 µg eingesetztem Protein relativ schwach. Dies könnte daran liegen, dass das SP-B als sehr kleines Protein relativ wenige Aminosäuren enthält, die im UV-Bereich absorbieren.

Um eine größere Menge des Spaltproduktes zu isolieren wurden daher 50 µg SP-B Dimer mit Sepharose-Esterase über Nacht bei RT geschüttelt. Nach Abtrennung von der Sepharose-Esterase und Waschen des Filterkuchens wurde mit der Waschfraktion die HPLC durchgeführt. Die gesammelten Fraktionen wurden den Peaks entsprechend gepoolt und auf ein SDS-PAGE aufgetragen.

Abb.32: HPLC-Lauf 50 µg SP-B + Seph.-Esterase (279 nm).

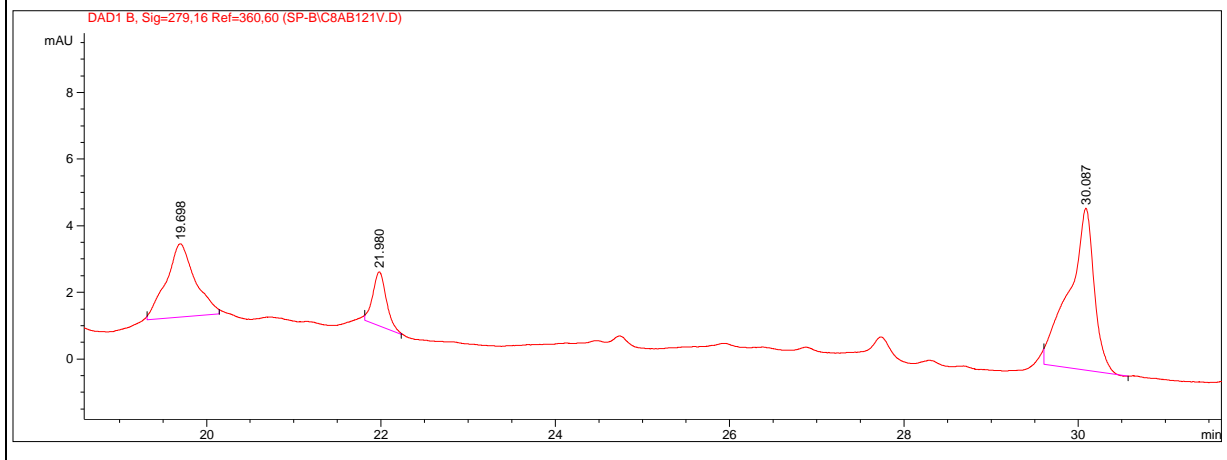


Abb.33: HPLC-Lauf 50 µg SP-B + Sepsin-Esterase (220 nm).

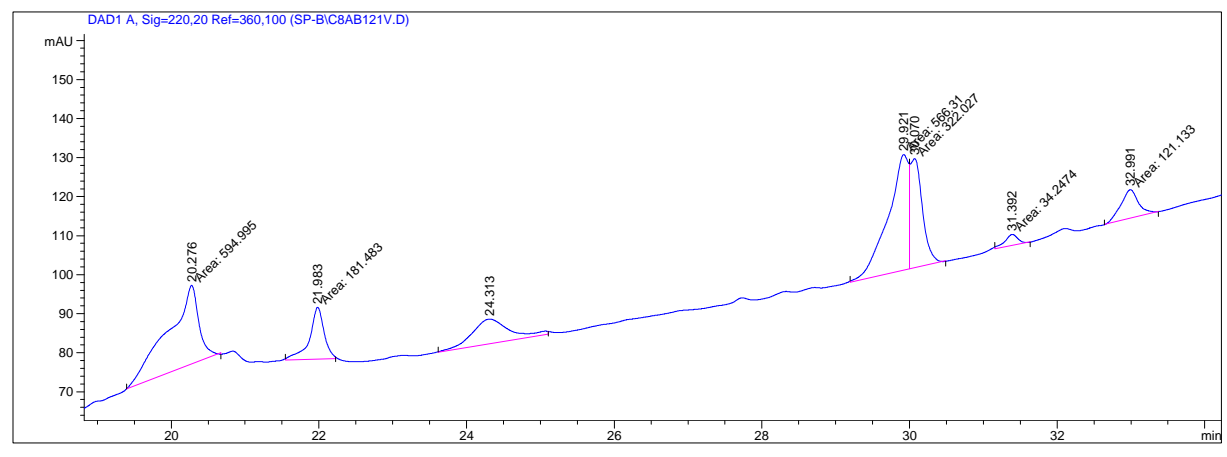
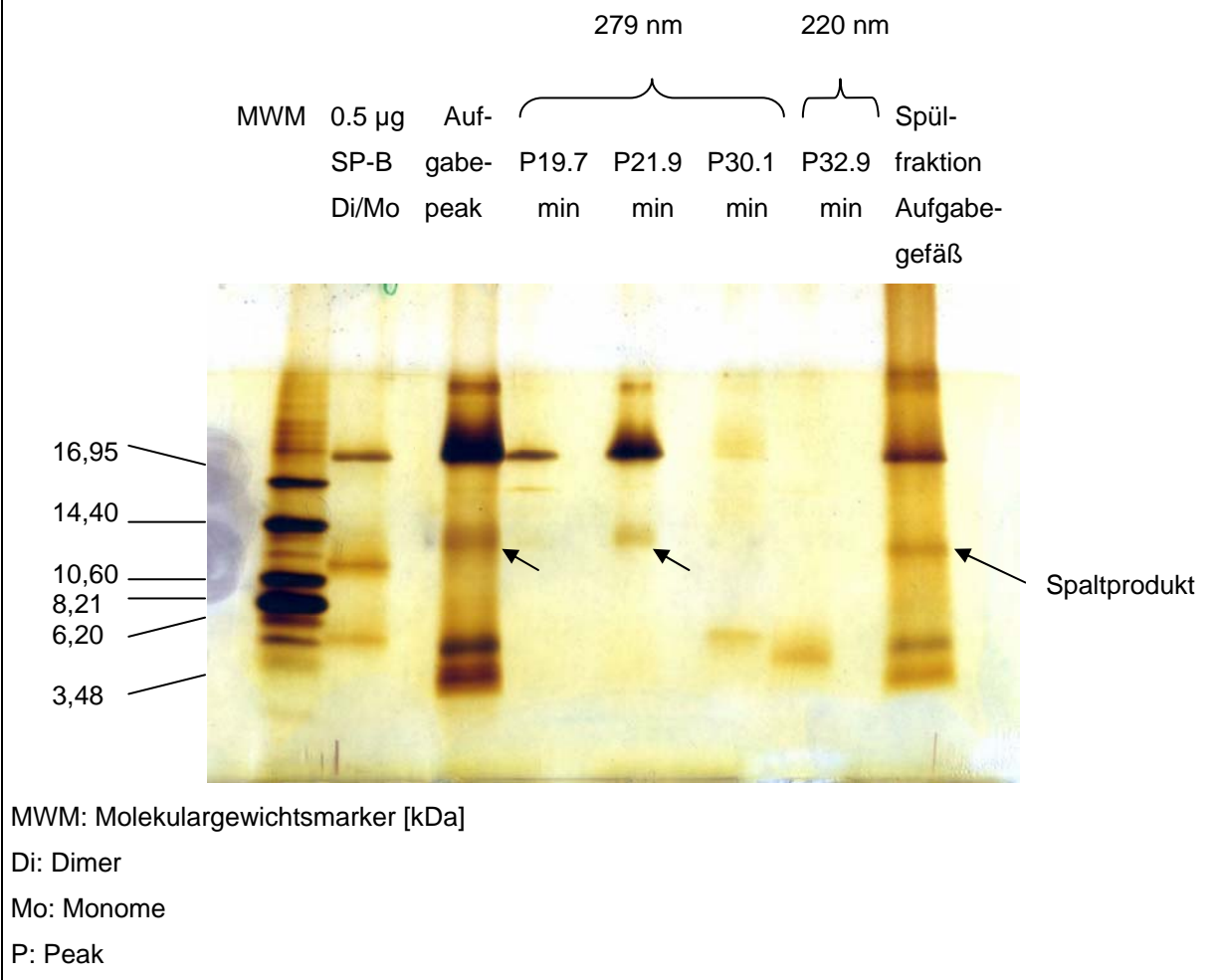


Abb.34: In vitro Konversion SP-B + Seph.-Esterase.



Hierbei zeigte sich, dass der Peak P21.9 (279 nm) das vorher bereits identifizierte Spaltprodukt enthält. Darüber hinaus fanden sich weitere niedermolekulare Peptide, die entweder enthaltenen Spuren von SP-C oder auch weiteren Spaltfragmenten des SP-B entsprechen könnten.

Ein Großteil der aufgegebenen Substanz fand sich im Aufgabepack wieder, lief also ohne Trennwirkung am Säulenmaterial vorbei. Dies konnte im Weiteren durch die Wahl eines Säulenmaterials mit größerer Porenweite vermieden werden.

Auch in der Spülfraktion des Aufgabegeräßes fand sich im SDS-Page einer großer Teil der Proteine, da die Löslichkeit des SP-B in Ethanol begrenzt ist.

4.4.2. In vitro Konversion von LSA mit anschließender HPLC und SDS-PAGE

Für die folgenden Läufe wurde eine C₈-Säule mit einer Porenweite von 300 Å verwendet (300 Octyl 6 MB, 5 µm, 250 x 4 mm, Grom, Rottenburg-Hailfingen).

Zur Verkürzung der Laufzeit wurden die Laufparameter leicht verändert. Die Elution wurde mit 80% Phase A begonnen und endete nach 30 min bei 100% Phase B, der Flow beträgt 0.7 ml/min. Die Retentionszeiten verkürzten sich hierdurch um einige Minuten (Abb. 35).

LSA wurden durch Zentrifugation aus Kaninchen-Lavage isoliert und rotiert. Nach Bligh & Dyer-Trennung der in vitro Konversionsansätze und HPLC (wie oben beschrieben) der organischen Phase wurden in Anlehnung an die ELISA-Daten (Abb. 35 und 36) die Eluate mit den Retentionszeiten von 22 min bis 28 min gesammelt und zum Nachweis des Spaltproduktes auf ein SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 37).

Abb. 35: Chromatogramm HPLC-Lauf LSA nach in vitro Konversion (279 nm) mit ELISA-Daten.

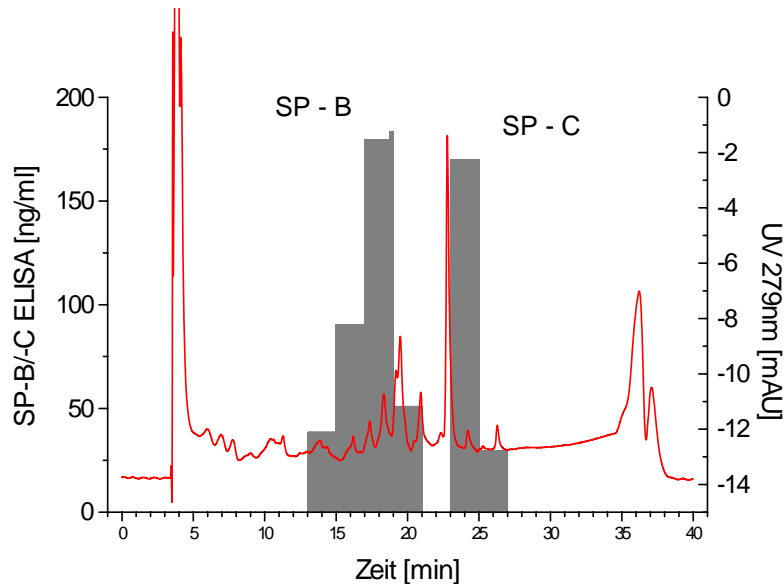


Abb. 36: Chromatogramm HPLC-Lauf "LSA nach in vitro Konversion" (220 nm) mit ELISA-Daten.

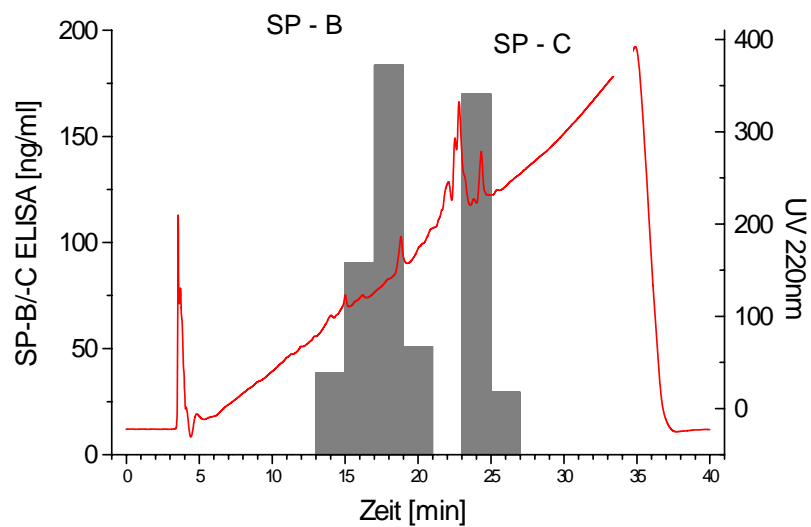
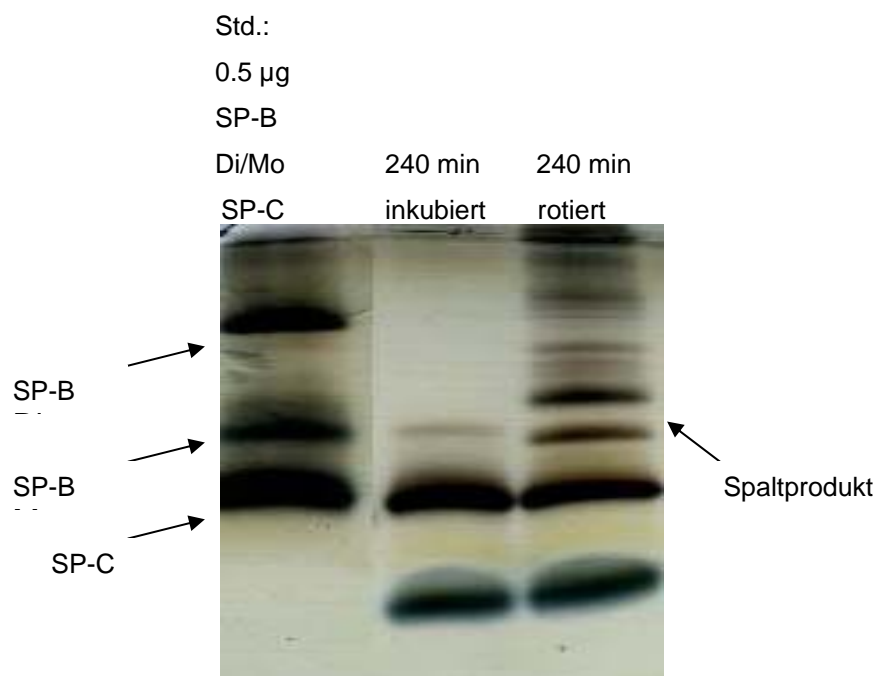


Abb. 37: SDS-PAGE der HPLC-Fraktionen (F) "LSA nach in vitro Konversion".



Std.: Standard

Di: Dimer; Mo: Monomer

In der rotierten Probe war neben einigen anderen Banden eine Bande zu sehen, die etwas oberhalb des SP-B Monomers lag und in der nicht rotierten Probe nicht zu sehen war. Diese Bande passte zu der Bande, die in den bisherigen Versuchen als Spaltprodukt identifiziert worden war.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war erstens zu klären, ob die Surfactantkonversion überhaupt durch eine Esterase induziert werden kann, oder sogar von der Anwesenheit einer solchen abhängig ist. Da diese Annahme bestätigt werden konnte, war zweitens zu klären, welche Komponente des Surfactantsystems als Substrat dient.

Die These, dass die Surfactantkonversion ein enzymabhängiger Prozess ist wurde vor Beginn dieser Arbeit bereits durch einige Studien gestützt [220, 221]. In diesen Vorarbeiten war ein DFP bindendes Enzym als Auslöser der Surfactantkonversion in vitro identifiziert und als Konvertase titulierte worden [222, 223, 224, 225]. In einigen Vorarbeiten konnte die Giessener Gruppe zeigen, dass die Surfactantkonversion in vitro durch Zugabe von synthetischen Serinprotease-Inhibitoren gehemmt werden kann [226].

Angesichts der bisherigen Abhängigkeit des enzymatisch getriggerten Konversionsvorganges von zyklischen Oberflächenveränderungen existieren allerdings bis heute Zweifel, ob tatsächlich ein spezifisches Enzym die Konversion reguliert.

Esterasen sind im Organismus ubiquitär vorhanden, sie besitzen eine breite Substratspezifität und spalten bekanntermaßen ebenso Ester- (Esterasefunktion) wie Peptidbindungen (Amidasefunktion).

In der vorliegenden Arbeit konnte in diversen Pools von Kaninchenlavagen unterschiedlichen Alters, in frischer BAL, in Alveolarmakrophagen und auch in deren Lysaten Esterase- und Amidaseaktivität nachgewiesen werden. Es konnte also gezeigt werden, dass die kausal an der Surfactantkonversion beteiligte Aktivität nicht nur in Typ II Zellen [220, 221], sondern auch in inflammatorischen Zellen des alveolären Kompartimentes vorhanden und möglicherweise auch differenziert reguliert ist. Unter pathologischen Bedingungen könnten daher möglicherweise mehrere Esteraseformen die gesteigerte Konversion des Surfactant vermitteln, zumal die humane Monozyten-Makrophagen-Serin-Esterase (HMMSE) einen hohen Verwandtschaftsgrad mit der Typ II Zellen Konvertase aufweist.

Dass eine ES-2 Esterase tatsächlich für die Konversion des pulmonalen Surfactant verantwortlich ist, konnte durch eine Reihe von Experimenten hier unter Beweis gestellt werden:

1) Nach Rekonstitution mit SP-A zeigten organische Extrakte aus Kaninchen BAL die alle Neutrallipide, Phospholipide, SP-B und SP-C enthielten, eine klare Abhängigkeit des Konversionsumfangs von der Gegenwart einer ES-2 Schweineleberesterase.

2) In vitro Konversionsansätze unter Verwendung von synthetischen Surfactantpräparationen mit variablen Apoproteinzusätzen in An- bzw. Abwesenheit von Schweineleberesterase bestätigten diese Beobachtung. Zudem erwies sich ein hoher Gehalt an SP-B als protektiv bezüglich der Konversion von LSA zu SSA, wohingegen variable Anteile der übrigen Surfactantproteine keinen nennenswerten Einfluß auf die Konversion zeigten.

Diese Abhängigkeit des Konversionsgrades vom SP-B-Gehalt lässt bereits auf eine direkte Integration des SP-B in den Konversionsvorgang, möglicherweise im Sinne eines Substrates schließen.

Bemerkenswert war allerdings die Tatsache, dass bei fehlender Zugabe von SP-B durch die Anwesenheit der Esterase in den Phospholipidpräparationen eine maximale Konversion induziert werden konnte, die bei Abwesenheit des Enzyms ausblieb. Dies ist insofern überraschend als schon die korrekte Ausbildung von LSA überhaupt an die Gegenwart von SP-B gebunden ist [203, 204]. Es wäre daher vielmehr zu erwarten gewesen, dass sich keine regulären LSA ausgebildet hätten und die An- oder Abwesenheit von Esteraseaktivität keinerlei Einfluß gezeigt hätte.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Aufreinigung der hier verwendeten hydrophoben Apoproteine aus Kaninchenlavage über die LH-60-Chromatographie zu finden sein. Geringgradige Verunreinigungen sind bei dieser gegenwärtig benutzten Technik der LH 60-Chromatographie nicht komplett auszuschließen. In der Folge könnten doch minimale Mengen an SP-B in den eigentlich als SP-B frei definierten Ansatz verblieben sein, die zur Ausbildung LSA artiger Strukturen geführt und somit als Substrat gedient haben könnten.

Auch von Dhand et al. wurde ein mit SP-A und SP-B rekonstituierter, synthetischer Surfactant als Ausgangsmaterial für in vitro Konversionsexperimente benutzt, in denen der Einfluß gereinigter Konvertase bzw. Phospholipase D [257] untersucht wurde. In diesen Untersuchungen wurde die hier ebenfalls dokumentierte Enzymabhängigkeit der Konversion von Phospholipid-Mituren mit SP-A und SP-B festgestellt, im Gegensatz zu den hier gemachten Beobachtungen berichten die

Autoren allerdings auch von einer enzymunabhängige Konversion von reinen DPPC/PG-Gemischen ohne Zusatz von Apoproteinen und führen dies auf physikalische Effekte zurück.

Frühere Untersuchungen der Gießener Gruppe zeigten in Ergänzung hierzu, dass die Blockierung der Esterase- und Amidasefunktion mittels synthetischer Serinproteaseinhibitoren zu einer Hemmung der in vitro Konversion führt [226].

Unklarheit bestand längere Zeit, welche Surfactantkomponente als Substrat der Konvertase fungiert. In einem Bericht von Dhand et al. wurde DPPC als mögliches Substrat der Konvertase diskutiert [258, 259]. Die Tatsache, dass diese Surfactantkomponente wesentlich für die Reduktion der Oberflächenspannung verantwortlich ist [9] und im Rahmen der Konversion auch ein Abfall der Oberflächenaktivität der LSA beobachtet wurde [219], läßt eine solche Annahme durchaus zu. Es zeigte sich hierbei jedoch, dass die Konvertase nicht in der Lage war Cholin aus DPPC freizusetzen [260], so dass die Autoren diese These verwarfen. In anderen, zum Teil auch eigenen Studien, wurde SP-B als mögliches Ziel der Esterase diskutiert, da die Antigenspiegel des SP-B nach Konversion in den LSA abfallen [151, 196, 219, 259]. SP-B wäre auch aufgrund seiner immensen Bedeutung für die Ausbildung der biophysikalisch hochaktiven LSA [203, 204] ein naheliegender Kandidat als Substrat der Konvertase.

Inchley et al. [261] bestätigten zwar die Ansicht, dass ein Verlust an SP-B aus den LSA in ursächlichem Zusammenhang mit deren Umbau zu SSA und somit dem Verlust an biophysikalischer Aktivität stehe, allerdings führten sie diesen Effekt auf eine kummulative Adhäsion des SP-B an der Gefäßwand der Reaktionsgefäße zurück.

Auch unsere Arbeitsgruppe fand sowohl in den LSA rotierter BAL, als auch in den LSA von Patienten mit Acute Respiratory Distress Syndrome einen deutlich reduzierten SP-B-Gehalt [219]. Im Gegensatz zu Inchley konnte bei den von uns durchgeführten Versuchen ein wesentlicher Verlust von SP-B durch Adhäsion an der Gefäßwand jedoch nicht beobachtet werden.

Bei Analyse der Surfactantsubfraktionen zeigte sich der SP-B-Verlust in den LSA sowohl absolut, als auch bezogen auf deren Phospholipidgehalt [219]. In den SSA blieb der absolute SP-B-Gehalt jedoch konstant und war nur bezogen auf den Phospholipidgehalt in den SSA erniedrigt. Kurz gesagt war eine "Verdünnung" des

SP-B in den SSA durch hinzugekommene Phospholipide eingetreten, die den LSA "verloren gegangen" waren. Da dem SP-B-Verlust in den LSA keine solche Verschiebung zugrunde gelegen hatte, ist die Schlußfolgerung naheliegend, dass das Protein degradiert worden war.

Zur Überprüfung dieser These wurde aus Kaninchenlavage isoliertes SP-B mit Schweineleberesterase umgesetzt und tatsächlich konnte eine neue, in gleichbehandelten SP-B-Kontrollen nicht vorhandene, Bande bei ca.12 kDa und gleichzeitigen Reduzierung der Dimer-Bande im SDS-PAGE detektiert werden. Zwar war diese Beobachtung gut reproduzierbar, allerdings traten des öfteren Störbanden durch die Esterase auf, insbesondere bei Auftrag größerer Mengen, so dass die eindeutige Zuordnung etwas erschwert wurde. Dieses Problem konnte erfolgreich durch Kopplung der Esterase an Lysin-Sepharose umgangen werden. Die Esterase war nun kovalent an ein Trägermaterial gebunden und konnte somit ganz einfach durch Filtration aus dem Reaktionsansatz entfernt werden.

Darüber hinaus wurde die Analytik der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in der Vergangenheit zum einen durch ihr geringes Molekulargewicht und zum anderen durch ihre ausgeprägte Hydrophobizität erschwert. Es gibt bislang nur wenige befriedigende Arbeiten hinsichtlich chromatographischen Trennverfahren dieser Proteine. In einer Studie von Bünger et al. wurde Sepharose als Säulenmaterial für ein HPLC-Verfahren angewandt [245], das jedoch wenig druckstabil ist und daher relativ breite Peaks lieferte.

Vorteilhafter erschien hier die reversed phase HPLC [256]. Diese Methode erlaubt die Verwendung niederer Alkohole, die polarer sind als z. B. Tetrahydrofuran oder Acetonitril. Somit kann der zur Retention der Peptide benötigte Wasseranteil in der Phase reduziert werden. Dadurch wird die Gefahr der Aggregation und Denaturierung dieser sehr unpolaren Peptide minimiert. Diese Methode ermöglicht damit Laufbedingungen, unter denen die Sekundärstruktur der Peptide gewahrt bleibt und unter Umständen sogar verschiedene Isoformen und Konformationen eines Peptids aufgetrennt werden können.

Unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen konnten mittels der rp-HPLC SP-B, SP-C und Phospholipide sicher getrennt werden. Die Trennung von SP-B Dimer und seinem Spaltprodukt aus der Inkubation mit Schweineleberesterase

gelang auch mit einer Porengröße des Säulenmaterials von 300Å nicht ausreichend, um eine Sequenzanalyse direkt aus der HPLC-Fraktion zu ermöglichen.

Unbeschadet von der hier angewendeten Nachweismethode war aber immer wieder ein primäres Spaltprodukt von ca. 12 kDa nachweisbar.

Zudem ergaben sich Hinweise, dass es möglicherweise mehr als ein Spaltprodukt des SP-B Dimers gibt. In einigen SDS-PAGEs der Umsetzungen von SP-B Dimer mit Schweineleberesterase waren mitunter noch wenigstens zwei schwächere Banden zu identifizieren, die hoher Wahrscheinlich nicht von der Esterase stammten, denn diese war ja zuvor durch Filtration aus dem Reaktionsansatz entfernt worden.

Dabei ist noch völlig unklar, ob die eventuellen weiteren Spaltprodukte zugleich mit dem Hauptspaltprodukt, oder in Folge des weiteren Zerfalls des einen Spaltproduktes entstehen.

Die N-terminale Sequenzierung der in erster Linie als Spaltprodukt identifizierten, kräftigsten Bande bei 12 kDa erfolgte aus dem Western Blot und ergab vollständige Übereinstimmung der N-terminalen 26 Aminosäuren des Spaltprodukts mit der entsprechenden Sequenz des SP-B. Dies beweist, dass das im Gel nachweisbare tatsächlich ein Spaltprodukt des SP-B Dimers darstellt. Gleichmaßen stellt dies unter Beweis, dass eine ES-2 Carboxylesterase wie die verwendete Schweineleberesterase in der Lage ist sowohl die Konversion zu induzieren, als auch SP-B Dimer zu degradieren.

Diese Spaltproduktbande konnte im SDS-PAGE mit HPLC-Fractionen aus Läufen mit rotierten Kaninchen-LSA nachgewiesen werden.

Die in vitro Konversion von natürlichem pulmonalen Surfactant ist abhängig von zyklischen Oberflächenveränderungen. Dagegen bleibt das LSA zu SSA Verhältnis in nicht rotierten Proben, die lediglich bei 37°C inkubiert wurden, im Vergleich zum Ausgangswert unverändert. Die zyklischen Oberflächenveränderungen sind auch für den Ablauf der in vivo Konversion wesentlich. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe sprechen hierbei für einen "Feedback" Mechanismus, in dem die Konvertase eine regulierende Funktion in dem metabolischen Kreislauf der LSA übernimmt. In diesem wird der Phospholipidfilm der frisch sezernierten LSA durch die periodischen Oberflächenveränderungen während der Atmung zunächst wiederholt gestaucht und gedehnt und somit die eingebundenen Apoproteine angreifbar für die Konvertase. Im

Folgendes wird hierbei insbesondere das SP-B degradiert, wodurch die Oberflächenaktivität und die Integrität der LSA abnehmen. Infolge der zunehmenden Filminstabilität können die ursprünglichen Kompressionsgrade nun nicht mehr erreicht werden. Hierdurch könnte der Zugang der Konvertase zu ihrem Substrat erschwert sein.

Bei den hier durchgeführten in vitro Konversionsexperimenten konnte in Abwesenheit von Phospholipiden allerdings eine Degradation des SP-B auch ohne die definierten zyklischen Oberflächenveränderungen allein durch Schütteln erzielt werden. Dies steht jedoch im Einklang mit der Vorstellung, dass das SP-B physiologischerweise in das Phospholipidgerüst der LSA eingebettet und ohne die wiederholte Dehnung und Stauchung dieses Gerüsts vor einem enzymatischen Angriff relativ geschützt ist. Dieser Schutz fällt bei Abwesenheit der Phospholipide weg, so dass einem direkten Angriff des Enzyms nichts im Wege steht.

In einem Experiment mit kommerziellen Esterase-Acrylbeads konnte das Spaltprodukt des SP-B auch in der inkubierten Kontrollprobe, d. h. sogar ohne kontinuierliche Durchmischung, mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (siehe Abb. 30).

Die exogene Applikation von natürlichem Surfactant oder synthetischen Surfactantpräparationen ist vor allem beim IRDS inzwischen gut etabliert und hat die durch dieses Krankheitsbild bedingte ehemals hohe Sterblichkeitsrate geradezu halbiert [196, 197, 198]. Auch beim ARDS wird diese Therapie inzwischen erfolgreich im Rahmen von Studien eingesetzt [199, 200, 201]. Allerdings ist der Therapieerfolg hierbei zeitlich auf oft nur wenige Stunden begrenzt. Da, wie in dieser Arbeit gezeigt, Alveolarmakrophagen deutliche Esteraseaktivität zeigen, könnten diese in Addition zu den anderen aktivierten inflammatorischen Mediatoren vor Ort konversionsverstärkend wirken.

Synthetische Serinproteaseinhibitoren sind in vitro geeignete Hemmstoffe der Surfactantkonversion [226]. Diese Derivate des Bisbenzamidins sind zudem in den erforderlichen Dosen weder toxisch, noch beeinflussen sie die Oberflächenaktivität des Surfactant auf unspezifische Weise, beispielsweise durch Lösungseffekte im Phospholipidmonolayer.

In der Zusammenschau aller Befunde ist die Surfactantkonversion als vermutlich enzymabhängiger Prozeß anzusehen und ebenso hochwahrscheinlich stellt das SP-B das entscheidende Substrat dieses enzymatischen Prozesses dar.

Ein mögliches nächstes Ziel könnte die Testung der Bisbenzamidinderivate im Tiermodel auf ihre surfactantprotektive Wirkung sein. Sollte sich die ihre in vitro demonstrierte Effektivität bestätigen, so ergeben sich hier möglicherweise neue verbesserte Therapieoptionen bezüglich der Surfactantapplikation. Der applizierte Surfactant könnte durch Zusatz von Esteraseinhibitoren mit einem wirksamen Schutz gegen das aggressiv veränderte, inflammatorische Milieu im alveolären Kompartiment versehen und so seine Wirkdauer verlängert werden. Dies ersparte dem Patienten die ansonsten notwendige Mehrfachapplikation des auch noch sehr teuren Medikaments.

Aus dieser Erkenntnis ergeben sich natürlich eine Reihe von Optionen zur Optimierung der transbronchialen Surfactanttherapie beim ARDS oder anderen akut inflammatorischen Lungenerkrankungen. So könnte der Einsatz der oben genannten Serinproteaseinhibitoren die Wirksamkeit einer exogenen Surfactantgabe verlängern und einem vorschnellen Abbau des exogenen Surfactantmaterials entgegenwirken.

6. Zusammenfassung

Das in der Alveole der Säugerlungen vorkommende Surfactantmaterial kann in sogenannte small und large surfactant aggregates aufgetrennt werden. Zu den large surfactant aggregates zählen Lamellarkörperchen und tubuläres Myelin, also die biophysikalisch hochaktiven Präkursoren des interfacialen Surfactantfilms. Unter den Prämissen einer akuten respiratorischen Insuffizienz ist wiederholt festgestellt worden, dass die Verteilung zwischen den large surfactant aggregates und small surfactant aggregates sehr zugunsten der small surfactant aggregates verschoben ist. Hieraus resultierend findet sich ein Übergewicht dieser, biophysikalisch weitgehend inaktiven, Abbauprodukte des Grenzflächenfilms. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Doktorarbeit der Fragestellung nachgegangen, wodurch die alveoläre Umwandlung der large in die small surfactant aggregates, ein als Surfactantkonversion bezeichneter Vorgang, vermittelt wird, und ob diese Surfactantkonversion ein enzymatisch getriggelter Prozess ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurde als Ausgangsmaterial eine gepoolte bronchoalveoläre Lavage von gesunden Kaninchen, sowie ein rekonstituiertes Surfactantmaterial verwendet. Methodisch kamen weiterhin chromatographische, elektrophoretische, biophysikalische Verfahren, sowie Enzymaktivitäts-Assays zur Anwendung.

Zunächst einmal konnte festgestellt werden, dass für die weitreichende Konversion von Surfactant in vitro in der Tat die Gegenwart einer Esterase notwendig ist. Weiterhin ergab sich im Rahmen der Rekonstitutionsversuche mit variablen Surfactant-Apoproteinen ebenfalls der Hinweis, dass vor allen Dingen der relative Gehalt an SP-B einen weitreichenden Einfluss auf den Konversionsgrad ausübt. Bei der Untersuchung der Herkunft der Esteraseaktivität in der BAL zeigte sich, dass im Überstand der resuspendierten Zellen der bronchoalveolären Lavage, wie auch im Zelllysat erhebliche Mengen an Esteraseaktivität nachweisbar waren. Weiterhin wurde festgestellt, dass unter den Bedingungen einer in vitro Konversion die Esteraseaktivität in den Subfraktionen alveolären Surfactans zeitabhängig abfiel. So war in den large surfactant aggregates 42 min nach Beginn der in vitro Konversion überhaupt keine Esteraseaktivität und nur noch etwa ein Viertel der Amidaseaktivität nachweisbar.

Auf der Suche nach dem möglichen Substrat dieser Esterase wurde sowohl für die natürliche, wie auch für isoliert mit - an Sepharose gekoppelter - Esterase inkubiertem Surfactantprotein B der Nachweis erbracht, dass im Rahmen des Konversionsprozesses das dimere SP-B abgebaut und ein Spaltprodukt in einem Molekulargewichtsbereich von 11-14 kDa neu auftritt. Eine aminoterminal Sequenzierung dieses Spaltproduktes ergab zweifelsfrei den Nachweis eines Surfactantprotein B entstammenden Proteins und zwar des aminoterminalen Anteils des SP-B. Dieses Spaltprodukt konnte durch ein neu entwickeltes HPLC-Verfahren zur Auftrennung der hydrophoben Surfactantproteine aus der BAL weiter aufgereinigt werden.

Zusammenfassend ergibt sich auf der Basis der hier vorliegenden Daten der Befund, dass die Umwandlung von large in small surfactant aggregates und der hiermit verbundene Verlust der Oberflächenaktivität nicht nur von der Größe der Oberflächenveränderung, sondern zudem von der Gegenwart einer enzymatischen Aktivität abhängig sind. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchung konnte der Nachweis einer Esteraseaktivität sowohl in den Zellen der BAL, wie auch im zellfreien Überstand erbracht werden. Als mögliches Substrat dieser Aktivität konnte das Surfactantprotein B identifiziert werden, für welches das Auftreten eines 11-14 kDa großen Spaltproduktes einwandfrei belegt werden konnte. Aus der Kenntnis dieser Ergebnisse leiten sich mögliche neue Therapieoptionen für das Acute Respiratory Distress Syndrome, wie auch für den Ventilator Induced Lung Injury ab, bei denen Verschiebungen des alveolären Surfactantpools zugunsten der small surfactant aggregates wiederholt beschrieben worden sind.

Summary

The alveolar surfactant pool can be separated into the “large surfactant aggregates” (LSA) and the “small surfactant aggregates” (SSA). The LSA, including lamellar bodies and tubular myelin, represent the biophysically highly active precursors of the interfacial surfactant film. Under cyclic area changes LSA are converted into the SSA (surfactant conversion). In contrast to LSA the SSA are clearly less surface active. Under clinical conditions of the acute respiratory distress syndrome, the balance of LSA to SSA is found to be switched in favour of SSA. Under these conditions, the alveolar surfactant pool predominantly consists of the largely inactive small surfactant aggregates, thus favouring impairment of gas exchange and lung function.

Drawn against this background we aimed to elucidate the mechanisms of the conversion process. To answer this question pooled bronchoalveolar lavages of healthy rabbits and reconstituted surfactant preparations were subjected to repetitive surface area changes in vitro and extent of conversion was analysed. Besides chromatographic, electrophoretic and biophysical techniques, enzyme activity assays were applied for experimental investigations.

It was found that an esterase activity is necessary for the induction of surfactant conversion under cyclic surface area changes. Experiments with various concentrations of the different surfactant proteins SP-A, SP-B or SP-C in reconstituted lipid mixtures revealed that only SP-B has a profound impact on the extent of in vitro conversion. Enzyme activity assays showed high esterase activity in complete cell suspensions of bronchoalveolar lavage and cell lysates. Under conditions of in vitro conversion, the esterase activity was found to decline in dependency of the incubation time, resulting in complete loss of esterase activity after 42 min of in vitro conversion.

With emphasis on the potential role of surfactant proteins as substrates of esterase activity, we could show that in vitro conversion of BAL as well as incubation of isolated SP-B with sepharose linked esterase would result in a cleavage of dimeric SP-B and detection of a new protein band with a molecular range of 11-14 kilodalton. Amino terminal sequencing revealed that this protein truly represents a cleavage product of the amino terminal part of SP-B. Further purification of the cleavage

product was performed by a new developed HPLC method for separation from other hydrophobic surfactant proteins and phospholipids.

In summary the presented data support the conclusion that conversion of large surfactant aggregates to small surfactant aggregates not only depends on cyclic changes of the air-liquid interface, but also on the presence of an esterase activity. This esterase activity was detected in the cytosolic fraction of BAL cells, mostly alveolar macrophages. A SP-B cleavage product with a molecular range of 11-14 kilodalton was identified upon in vitro incubation of esterase with SP-B and after in vitro conversion of a rabbit BAL pool, suggesting that SP-B is a substrate of the alveolar esterase. These data may help to identify new molecular targets to treat acute respiratory distress syndrome and ventilator induced lung injury.

7. Literatur

1. King, R. J.; Clements, J. A.; *Surface active materials from dog lung. II Composition and physiological correlations*. Am. J. Physiol. 223 (1972), 707-733.
2. Van Golde; L.M.G; Batenburg, J. J.; Robertson, B.; *The pulmonary surfactant system: biological aspects and physiological significance*. Physiol. Rev. 68 (1988), 374.
3. Possmayer, F.; *A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins*. Am. Rev. Respir. Dis. 138 (1988), 990-998.
4. Neergaard, K. v.; *Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen*. Z. Gesamte Exp. Med. 66 (1929), 373-394.
5. Laplace, P. S.; *Traité de Mécanique Céleste*. Crapelet, Courcier, Paris 5 (1798-1827).
6. Clements, J. A.; *Dependence of pressure-volume characteristics of lung on intrinsic surface active material*. Am. J. Physiol. 187 (1956), 592.
7. Clements, J. A.; *Surface tension of lung extracts*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95 (1957), 170-172.
8. Pattle, R. E.; *Properties, function and origin of the alveolar lining layer*. Nature (london) 175 (1955), 1125-1126.
9. Klaus, M. H.; Clements, J. A.; Havel, R. J.; *Composition of surface-active material isolated from beef lung*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47 (1961), 1858-1859.
10. Hallman, M.; Gluck, L.; *Phosphatidylglycerol in lung surfactant. III. Possible modifier of surfactant function*. J. Lipid Res. 17 (1976), 257-262.
11. Pattle, R. E.; Thomas, L. C.; *Lipoprotein composition of the film lining the lung*. Nature 189 (1961), 844.

12. King, R. J.; Clements, J. A.; *surface active materials from dog lung*. Am. J. Physiol. 223 (1972), 707-733.
13. King, R. J. Klass, D. J.; Gikas, E. G.; Clements, J. A.; *Isolation of apoproteins from canine surface-active material*. Am. J. Physiol. 224 (1973), 788-795.
14. Liggins, G. C.; *The role of cortisole in preparing the fetus for birth*. Reprod. Fertil. Dev. 6 (1994), 141-150.
15. Gross, I.; *Regulation of fetal lung maturation*. Am. J. Physiol. 259 (1993), 479-497.
16. Bolt, R. J.; van Weissenbruch, M. M.; Lafeber, H. N.; Delemarre-van de Waal, H. A.; *Glucocorticoids and Lung Development in the fetus and preterm infant*. Pediatric Pumonology 32 (2001), 76-91.
17. Hawgood, S.; *Surfactant: composition, structure and metabolism*. Crystal, R. G.; West, J. B. et al. (ed.): The Lung: Scientific Foundations. New York: Raven Press (1991), 247-261.
18. Crapo, J. D.; Young, S. L.; Fram, RE. K.; Pinkerton, K. E.; Barry, B. E.; Crapo, R. O.; *Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs*. Am. Rev. Respir. Dis. 128 (1983), 42-46.
19. Sanchez-Esteban, J.; Cicchiello, L.; Wang. Y.; Tsai, S.-W.; Williams, L. K.; Torday, J. S. Rubin, L. P.; *Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation*. J. Appl. Physiol. 91 (2001), 589-595.
20. Edwards, Y. S.; *Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 129 (1) (2001), 245-260.
21. Dobbs, L. G.;Gutierrez, J. A.; *Mechanical forces modulate alveolar epithelial phenotypic expression*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 129 (1) (2001), 261-266.
22. Flecknoe, S.; Harding, R.; Martiz, G.; Hooper, S. B.; *Increased lung expansion alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 278 (2000), L1180-L1185.

23. Flecknoe, S. J.; Wallace, M. J.; Harding, R.; Hooper, S. B.; *Determination of alveolar epithelial cell phenotypes in fetal sheep: evidence for the involvement of basal lung expansion.* J. of Physiol. 542 (1) (2002), 245-253.
24. Dobbs, L. G.; Wright, J. R.; Hawgood, S.; Gonzalez, R.; Venstrom, K.; Nellenbogen, J.; *Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholin from cultured rat alveolar type II cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 1010-1014.
25. Rice, W. R.; Ross, G. F.; Singleton, F. M.; Dingle, S.; Whitset, J. A.; *Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells.* J. Appl. Physiol.: Resp. Environ. Exercise Physiol. 63 (1987), 692-698.
26. Kuroki, Y.; Mason, R. J.; Voelker, D. R.; *Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 5566-5570.
27. Kuroki, Y.; Mason, R. J.; Voelker, D. R.; *Chemical modification of surfactant protein A alters high affinity binding to rat alveolar type II cells and regulation of phospholipid secretion.* J. Biol. Chem. 263 (1988), 17596- 17602.
28. Hawgood, S.; Benson, B. J.; Schilling, J.; Damm, D.; Clements, J. A.; White, R. T.; *Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 66-70.
29. Yu, S. H.; Possmayer, F.; *Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures.* Biochim. Biophys. Acta 1046 (1990), 233-241.
30. Chevallier, G.; Collet, A. J.; *In vivo incorporation of cholin-3H, leucine-3H and galactose-3H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy.* Anat. Rec. 174 (1972), 289-310.
31. Gil, J.; Reiss, O. K.; *Isolation and characterization of lamellar bodies and tubular myelin from rat lung homogenates.* J. Cell Biol. 58 (1973), 152-171.

32. Williams, M.C.; *Ultrastructure of tubular myelin and lamellar bodies in fast-frozen adult rat lung*. Exp. Lung Res. 4 (1982), 37-46
33. Williams, M. C.; *Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs*. J. Cell Biol. 72 (1977), 260-277.
34. Suzuki, Y.; Fujita, Y.; Kogishi, K.; *Reconstitution of tubular myelin from synthetic phospholipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant*. Am. Rev. Respir. Dis. 140 (1989), 75-81.
35. Voorhout, W. F.; Veenendaal, T.; Haagsman, H. P.; Verkleij, A. J.; van Golde, L. M. G.; Geuze, H. J.; *Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice*. The J. of Histochem. and Cytochem. 39 (1991), 1331-1336.
36. Wright, J. R.; Benson, B. J.; Williams, M. C.; Goerke, J.; Clements, J. A.; *Protein composition of rabbit alveolar surfactant subfractions*. Biochim. Biophys. Acta 791 (1984), 320-332.
37. Gross, N. J.; Narine, K. R.; *Surfactant subtypes in mice: characterization and quantification*. J. Appl. Physiol. 66(1) (1988), 342-349.
38. Gross, N. J.; Narine, K. R.; *Surfactant subtypes of mice: metabolic relationships and conversion in vitro*. J. Appl. Physiol. 67(1) (1989), 414-421.
39. Gross, N. J.; Kellam, M.; Young, J.; Krishnasamy, S.; Dhand, R.; *Separation of alveolar surfactant into subtypes*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162 (2000), 617-622.
40. Magoon, M. W.; Wright, J. R.; Bartussio, A.; Williams, M. C.; Goerke, J.; Benson, B. J.; Hamilton, R. L.; Clements, J. A.; *Subfraction of lung surfactant*. Biochim. Biophys. Acta 750 (1983), 18-31.
41. Stevens, P. A.; Wright, J. R.; Clements, J. A.; *Surfactant secretion and clearance in the newborn*. J. Appl. Physiol. 67 (1989), 1597-1605.
42. Jacobs, H. C.; Jobe, A. H.; Ikegami, M.; Jones, S.; *Reutilization of phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine by the pulmonary surfactant system in 3-day-old rabbits*. Biochim. Biophys. Acta 834 (1985), 172-179.

43. Hallman, M.; Epstein, B. L.; Gluck, L.; *Analysis of labeling and clearance of lung surfactant phospholipids in rabbit. Evidence of bidirectional surfactant flux between lamellar bodies and alveolar lavage.* J. Clin. Invest. 68 (1981), 742-751.
44. Jacobs, H.; Jobe, A.; Ikegami, M.; Jones, S.; *Surfactant phosphatidylcholine source, fluxes and turnover times in 3-day-old, 10-day-old, and adult rabbits.* J. Biol. Chem. 257 (1982), 1805-1810.
45. Geiger, K.; Gallagher, M. L.; Hedley-Whyte, J.; *Cellular distribution and clearance of aerosolized dipalmitoyl lecithin.* J. Appl. Physiol. 39 (1975), 759-766.
46. Wright, J. R.; Youmans, D. C.; *Degradation of surfactant lipids and surfactant protein by alveolar macrophages in vitro.* Am. J. Physiol. 268 (1995), L772-L780.
47. Nichols, B. A.; *Normal rabbit alveolar macrophages.* J. Exp. Med. 144 (1976), 906-919.
48. Walker, S. R.; Williams, M. C.; Benson, B.; *Immunohistochemical localization of the major surfactant apoproteins in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung.* J. Histochem. Cytochem. 34 (1986), 1137-1148.
49. Baritussio, A. G.; Magoon, M. W.; Goerke, J.; Clements, J. A.; *Precursor-product relationship between rabbit type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material.* Biochim. Biophys. Acta 666 (1981), 382-393.
50. Wright, J. R.; Clements, J. A.; *Metabolism and turnover of lung surfactant.* Am. Rev. Respir. Dis. 136 (1987), 426-444.
51. Crystal, R. G.; West, J. B. et al.; *The Lung.* Bd.3.1.10. Ltd. New York: Raven Press (1991), 247-261.
52. Ballard, P. L.; *Hormonal regulation of pulmonary surfactant.* Endocrine Rev. 10 (1989), 165-181.
53. Gilfillan, A. M.; Rooney, S. A.; *Arachidonic acid metabolites stimulate phosphatidylcholine secretion in primary cultures of type II pneumocytes.* Biochim. Biophys. Acta 833 (1985), 336-341.

54. Rooney, S. A.; Gobran, L. I.; *Adenosine and leukotrienes have a regulatory role in lung surfactant secretion in the newborn rabbit*. Biochim. Biophys. Acta 960 (1988), 98-106.
55. Gilfillan, A. M.; Rooney, S. A.; *Purinoceptor agonists stimulate phosphatidylcholine secretion in primary culture of adult rat type II pneumocytes*. Biochim. Biophys. Acta 917 (1987), 18-23.
56. Gilfillan, A. M.; Rooney, S. A.; *The surfactant system and lung phospholipid biochemistry*. Am. Rev. Respir. Dis. 131 (1985), 439-460.
57. Nicholas, T. E.; Barr, H. A.; *The release of surfactant in rat lung by brief periods of hyperventilation*. Resp. Physiol. 52 (1983), 69-83.
58. Oyarzun, M. J.; Clements, J. A.; Baritussio, A.; *Ventilation enhances pulmonary alveolar clearance of radioactive dipalmitoylphosphatidylcholine in liposomes*. Am. Rev. Respir. Dis. 121 (1980), 709-721.
59. Oyarzun, M. J.; Clements, J. A.; *Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators and prostaglandines in the rabbit*. Am. Rev. Respir. Dis. 117 (1978), 879-891.
60. Gilfillan, A. M.; Rooney, S. A.; *Arachidonic acid metabolites stimulate phosphatidylcholine secretion in primary cultures of type II pneumocytes*. Biochim. Biophys. Acta 833 (1985), 336-341.
61. Rooney, S. A.; Gobran, L. I.; *Adenosine and leukotrienes have a regulatory role in lung surfactant secretion in the newborn rabbit*. Biochim. Biophys. Acta 960 (1988), 98-106.
62. Johansson, J.; Joernvall, H.; Curstedt, T.; *Human surfactant polypeptide SP-B. Disulfide bridges, C-terminal end and peptide analysis of the airway form*. FEBS Lett. 301 (1992), 165-167.
63. Redding, R. A.; Douglas, W. A. J.; Stein, M.; *Thyroid hormone influence upon lung surfactant metabolism*. Science 175 (1972), 994-996.
64. Smith, B. T.; Torday, J. S.; *Factors affecting lecithin synthesis by fetal lung cells in culture*. Pediatr. Res. 8 (1974), 848.

65. Kitterman, J.; Liggins, G. C.; Campos, G.; Forster, C.; Creasy, R.; *Hormonal factors in lung maturation in fetal lambs*. *Pediatr. Res.* 13 (1979), 537.
66. Taeusch, H. W.; Patterson, A.; Williams, L.; Colle, F.; *Plasma glucocorticoid concentration after injections of heroin, ACTH, saline and cortisol in fetal and neonate rabbits*. *Biol. Neonate* 30 (1977), 131.
67. Rooney, S. A.; Gross, J.; Warshaw, J. B.; *Thyrotropin-releasing hormone stimulates surfactant secretion in fetal rabbit*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117 (1978), 386.
68. Rooney, S. A.; Marino, P. A.; Gobran, L. J.; Gross, J.; Warshaw, J. B.; *Thyrotropin-releasing hormone increases the amount of surfactant in lung lavage from fetal rabbits*. *Pediatr. Res.* 13 (1979), 623.
69. King, R. J.; *Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant*. Amsterdam (NL): Elsevier (1989), 1-15.
70. Harwood, J. L.; *Lung surfactant*. *Biochem. Soc. Transact.* 15 (1987), 80S-89S.
71. Shelley, S. A.; Balis, J. U.; Paciga, J. E.; Espinoza, C. G.; Richman, A. V.; *Biochemical composition of adult human lung surfactant*. *Lung* 160 (1982), 195-206.
72. Hamm, H.; Fabel, H.; Bartsch, W.; *The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives*. *Clin. Invest.* 70 (1992), 637-657.
73. Schlame, M.; Casals, C.; Ruestow, B.; Rabe, H.; Kunze, D.; *Molecular species of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in rat lung surfactant and different pools of pneumocytes type II*. *Biochem. J.* 253 (1988), 209-215.
74. Kahn, M. C.; Anderson, G. J.; Anyan, W. R.; Hall, S. B.; *Phosphatidylcholine molecular species of calf lung surfactant*. *Am. J. Physiol.* 269 (1995), L567-L573.
75. Honda, Y.; Tsunematsu, K.; Suzuki, A.; Akino, T.; *Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases*. *Lung* 166 (1988), 293-301.

76. Hallman, M.; Spragg, R.; Harrel, J. H.; Moser, K. M.; *Evidence of lung surfactant failure in respiratory distress syndrome*. J. Clin. Invest. 70 (1982), 673-683.
77. Robinson, P. C.; Watters, L. C.; King, T. E.; Mason, R. J.; *Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in bronchoalveolar lavage fluid phospholipids*. Am. Rev. Respir. Dis. 137 (1988), 585-591.
78. Hayashi, H.; Adachi, H.; Kataoka, K.; Sato, H.; Akino, T.; *Molecular species profiles of acidic phospholipids in lung fractions of adult and perinatal rabbits*. Biochim. Biophys. Acta 1042 (1990), 126-131.
79. Beppu, O. S.; Clements, J. A.; Goerke, J.; *Phosphatidylglycerol-deficient lung surfactant has normal properties*. J. Appl. Physiol. 55 (1983), 496-502.
80. Egberts, J.; Beintema-Dubbeldam, A.; De Boers, A.; *Phosphatidylinositol and not phosphatidylglycerol is the important minor phospholipid in rhesus-monkey surfactant*. Biochim. Biophys. Acta 919 (1987), 90-92.
81. King, R. J.; Carmichael, M. C.; Horowitz, P. M.; *Reassembly of lipid-protein complexes of pulmonary surfactant. Proposed mechanism of interaction*. J. Biol. Chem. 258 (1983), 10672-10680.
82. King, R. J.; *Lipid-apolipoprotein interactions in surfactant studied by reassembly*. Exp. Lung Res. 6 (1984), 237-253.
83. Wright, J. R.; Wager, R. E.; Hawgood, S.; Dobbs, L.; Clements, J. A.; *Surfactant apoprotein Mr = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells*. J. Biol. Chem. 262 (1987), 2888-2894.
84. Rice, W. R.; Sarin, V. K.; Fox, J. L.; Baatz, J.; Wert, S.; Whitsett, J. A.; *Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells*. Biochim. Biophys. Acta 1006 (1989), 237-245.
85. Zapata, A.; Hernandez-Garcia, J. M.; Grande, C.; Martinez, I.; Perez, J.; La Fuente, P. de; Usandizaga, J. A.; *Pulmonary phospholipids in amniotic fluid in pathologic pregnancies: relationship clinical status of the newborn*. Scan. J. of Clin. and Lab. Invest. 49 (1989), 351-357.

86. Spillman, T.; Cotton, D. B.; Golunski, E.; *Detection frequency by thin-layer chromatography of phosphatidylglycerol in amniotic fluid with clinically functional pulmonary surfactant*. Clin. Chem. 34 (1988), 1976-1982.
87. McCormack, F. X.; King, T. E.; Voelker, D. R.; Robinson, P. C.; Mason, R. J.; *Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A*. Am. Rev. Resp. Dis. 144 (1991), 160-166.
88. Adachi, H.; Hayashi, H.; Sato, H.; Dempo, K.; Akino, T.; *Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica*. Biochem. J. 262 (1988), 781-786.
89. Schlame, M.; Ruestow, B.; Kunze, D.; Rabe, H.; Reichmann, G.; *Phosphatidylglycerol of rat lung. Intracellular sites of formation de novo and acyl species pattern in mitochondria, microsomes and surfactant*. Biochem. J. 240 (1986), 247-252.
90. Ruestow, B.; Nakagawa, Y.; Rabe, H.; Waku, K.; Kunze, D.; *Species pattern of phosphatidylinositol from lung surfactant and a comparison of the species pattern of phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol synthesized de novo in lung microsomal fractions*. Biochem. J. 254 (1988), 67-71.
91. Auten, R. L.; Watkins, R. H.; Shapiro, D. L.; Horowitz, S.; *Surfactant protein A (SP-A) is synthesized in airway cells*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3 (1990), 491-496.
92. Walker, S. R.; Williams M. C.; Benson, B.; *Immunocytochemical localization of the major surfactant apoproteins in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung*. J. Histochem. Cytochem. 34 (1986), 1137-1148.
93. Fisher, J. H.; Kao, F. T.; Jones, C.; White, R. T.; Benson, B. J.; Mason, R. J.; *The coding sequence for the 32,000-dalton pulmonary surfactant-associated protein A is located on chromosome 10 and identifies two separate restriction-fragment-length polymorphisms*. Am. J. Hum. Genet. 40 (1987), 503-511.
94. Floros, J.; Phelps, D. S.; Taesch, H. W.; *Biosynthesis and in vitro translation of the major surfactant-associated protein from human lung*. J. Biol. Chem. 260 (1985), 495-500.

95. Floros, J.; Steinbrink, R.; Jacobs, K.; Phelps, D.; Kritz, R.; Recny, M.; Sultzman, L.; Jones, S.; Taeusch, H. W.; Frank, H. A.; Fritsch, E. F.; *Isolation and characterization of cDNA clones for the 35-kDa pulmonary surfactant-associated protein*. J. Biol. Chem. 261 (1986), 9029-9033.
96. Bruns, G.; Stroh, H.; Veldman, G. M.; Latt, S. A.; Floros, J.; *The 35 kd pulmonary surfactant-associated protein is encoded on chromosome 10*. Hum. Genet. 76 (1987), 58-62.
97. White, R. T.; Damm, D.; Miller, J.; Spratt, K.; Schilling, J.; Hawgood, S.; Benson, B.; Cordell, B.; *Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene*. Nature 317 (1985), 361-363.
98. Lynn, W. S.; *Alveolyn-structure and source: a review*. Exp. Lung Res. 6 (1984), 191-196.
99. Phelps, D. S.; Floros, J.; Taeusch, J. R.; *Post-translational modification of the major human surfactant-associated proteins*. Biochem. J. 237 (1986), 373-377.
100. Phelps, D. S.; Floros, J.; *Proline hydroxylation alters the electrophoretic mobility of pulmonary surfactant-associated protein A*. Electrophoresis 9 (1988), 231-233.
101. Phelps, D. S.; Taeusch, H. W.; Benson, B.; Hawgood, S.; *An electrophoretic and immunochemical characterization of human surfactant-associated proteins*. Biochim. Biophys. Acta 791 (1984), 226-238.
102. Whitsett, J. A.; Hull, W.; Ross, G.; Weaver, T.; *Characteristics of human surfactant-associated glycoproteins A*. Pediatr. Res. 19 (1985), 501-508.
103. Vorhout, W. F.; Veenendaal, T.; Haagsman, H. P.; Weaver, T. E.; Whitsett, J. A.; Van Golde, L. M. G.; Geuze, H. J.; *Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment*. Am. J. Physiol. 263 (1992), L479-L486.
104. Benson, B.; Hawgood, S.; Schilling, J.; Clements, J.; Damm, D.; Cordell, B.; White, R. T.; *Structure of canine pulmonary surfactant apoprotein: cDNA and complete amino acid sequence*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 6379-6383.

105. Sano, K.; Fisher, J.; Mason, J. R.; Kuroki, Y.; Schilling, J.; Benson, B.; Voelker, D.; *Isolation and sequence of a cDNA clone for the rat pulmonary surfactant-associated (PSP-A)*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 144 (1987), 367-374.
106. Voss, T.; Eistetter, H.; Schaefer, K. P.; Engel, J.; *Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36. Structural homology with the complement factor C1q*. J. Mol. Biol. 201 (1988), 219-227.
107. King, R. J.; Simon, D.; Horowitz, P. M.; *Aspects of secondary and quaternary structure of surfactant protein A from canine lung*. Biochim. Biophys. Acta 1001 (1989), 294-301.
108. Haagsman, H. P.; White, R. T.; Schilling, J.; Lau, K.; Benson, B. J.; Golden, J.; Hawgood, S.; Clements, J. A.; *Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A*. Am. J. Physiol. 257 (1989), L421-L429.
109. Hawgood, S.; Efrati, H.; Schilling, J.; Benson, B. J.; *Chemical characterization of lung surfactant apoproteins: Aminoacid composition, N-terminal sequence and enzymic digestion*. Biochem. Soc. Trans. 13 (1985), 1092-1096.
110. Haagsman, H. P.; Sargeant, T.; Hauschka, P. V.; Benson, B. J.; Hawgood, S.; *Binding of calcium to SP-A, a surfactant-associated protein*. Biochemistry 29 (1990), 8894-8900.
111. Pison, U.; Max, M.; Neuendank, A.; Weissbach, S.; Pietschman, S.; *Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence of 'non-surfactant' functions of the surfactant system*. Eur. J. Clin. Invest. 24 (1994), 586-599.
112. Thiel, S.; Reid, K. B. M.; *Structures and function associated with the group of mammalian lectins containing collagen-like sequences*. FEBS Lett. 250 (1989), 78-84.
113. Reid, K.; *Structure/function relationships in the collectins (mammalian lectins containing collagen-like regions)*. Biochem. Soc. Trans. 21 (1993), 460-464.
114. Persson, A.; Chang, D.; Rust, K.; Moxley, M.; Longmore, W.; Crouch, E.; *Purification and Biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein*. Biochemistry 28 (1989), 6361-6367.

115. Kuroki, Y.; Shiratori, M.; Ogasawara, Y.; Tsuzuki, A.; Akino, T.; *Characterization of pulmonary surfactant protein D: its copurification with lipids*. Biochim. Biophys. Acta 1086 (1991), 185-190.
116. Rust, K.; Grosso, L.; Zhang, V.; Chang, D.; Persson, A.; Longmore, W.; Cai, G. Z.; Crouch, E.; *Human surfactant protein D: SP-D contains a C-type lectin carbohydrate recognition domain*. Arch. Biochem. Biophys. 290 (1991), 116-126.
117. Persson, A.; Chang, D.; Crouch, E.; *Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate binding protein*. J. Biol. CChem. 265 (1990), 5755-5760.
118. Crouch, E. C.; *Surfactant protein-D and pulmonary host defence*. Respir. Res. 1 (2000), 93-108.
119. Lu, J.; Willis, A. C.; Reid, K. B.; *Purification, characterization and cDNA cloning of human lung surfactant protein D*. Biochem. J. 284 (1992), 795-802.
120. Shimizu, H.; Fisher, J. H.; Pabst, P.; Benson, B.; Lau, K.; Mason, R. J.; Voelker, D. R.; *Primary structure of rat pulmonary surfactant protein D. cDNA and deduced amino acid sequence*. J. Biol. Chem. 267 (1992), 1853-1857.
121. Persson, A.; Rust, K.; Chang, D.; Moxley, M.; Longmore, W.; Crouch, E.; *CP4: a pneumocyte-derived collagenous surfactant-associated protein. Evidence for heterogeneity of collagenous surfactant proteins*. Biochemistry 27 (1988), 8576-8584.
122. Crouch, E.; Persson, A.; Chang, D.; Heuser, J.; *Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D)*. J. Biol. Chem. 269 (1994), 17311-17319.
123. Crouch, E.; Chang, D.; Rust, K.; Persson, A.; Heuser, J.; *Recombinant pulmonary surfactant protein D. Post-translational modification and molecular assembly*. J. Biol. Chem. 269 (1994), 15808-15813.
124. Pilot-Matias, T. J.; Kister, S. E.; Fox, J. L.; Kropp, K.; Glasser, S. W.; Whitsett, J. A.; *Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B*. DANN 8 (1989), 75-86.

125. Vamvakopoulos, N. C.; Modi, W. S.; Floros, J.; *Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12 – p11.2*. J. Cytogenet. Cell Genet. 68 (1995), 8-10.
126. Jacobs, K. A.; Phelps, D. S.; Steinbrink, R.; Fisch, J.; Kritz, R.; Mitsock, L.; Dougherty, J. P.; Taeusch, H. W.; Floros, J.; *Isolation of cDNA clone encoding a high molecular weight precursor to a 6-kDa pulmonary surfactant-associated protein*. J. Biol. Chem. 262 (1987), 9808-9811.
127. Glasser, S. W.; Korfhagen, T. R.; Weaver, T.; Pilot-Matias, T. J.; Fox, J. L.; Whitsett, J. A.; *cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL(Phe)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 4007-4011.
128. Revak, S. D.; Merritt, T. A.; Hallman, M.; Heldt, G.; La Polla, R. J.; Hoey, K.; Houten, R. A.; Cochrane, C. G.; *The use of synthetic peptides in the formation of biophysically active pulmonary surfactants*. Pediatr. Res. 29 (1991), 460-465.
129. Johansson, J.; Curstedt, T.; Joernvall, H.; *Surfactant protein B: disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities*. Biochemistry 30 (1991), 6917-6921.
130. Hawgood, S.; Shiffer, K.; *Structures and properties of the surfactant-associated proteins*. Annu. Rev. Physiol. 53 (1991), 375-394.
131. Hawgood, S.; *Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure*. Am. J. Physiol. 257 (1989), L13-L23.
132. Glasser, S. W.; Korfhagen, T. R.; Weaver, T. E.; Clark, J. C.; Pilot-Matias, T.; Meuth, J.; Fox, J. L.; Whitsett, J. A.; *cDNA, deduced polypeptide structure and chromosomal assignment of human pulmonary surfactant proteolipid, SPL(pVal)*. J. Biol. Chem. 263 (1988), 9-12.
133. Curstedt, T.; Johansson, J.; Barros-Soederling, J.; Robertson, B.; Nilsson, G.; Westberg, M.; Joernvall, H.; *Low-molecular-mass surfactant protein type 1. The primary structure of a hydrophobic 8-kDa polypeptide with eight half-cystine residues*. Eur. J. Biochem. 172 (1988), 521-525.
134. Phelps, D. S.; Floros, J.; *Localization of surfactant protein synthesis in human lung by in situ hybridisation*. Am. Rev. Respir. Dis. 137 (1988), 939-942.

135. Kalina, M.; Mason, R. J.; Shannon, J. M.; *Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells of rat lung*. Am: J. Respir. Cell Mol. Biol. 6 (1992), 594-600.
136. Glasser, S. W.; Korfhagen, T. R.; Perme, C. M.; Pilot-Matias, T. J.; Kister, S. E.; Whitsett, J. A.; *Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid*. J. Biol. Chem. 263 (1988), 10326-10331.
137. Curstedt, T.; Johansson, J.; Persson, P.; ERklund, A.; Robertson, B.; Loewenadler, B.; Joernvall, H.; *Hydrophobic surfactant-associated polypeptides: SP-C is a lipopeptide with two palmitoylated cysteine residues, whereas SP-B lacks covalently linked fatty acyl groups*. Proc. Acad. Sci. USA 87 (1990), 2985-2989.
138. Creuwels, L. A. J. M.; Demels, R. A.; Van Golde, L. M. G.; Haagsman, H. P.; *Characterization of a dimeric canine Form of surfactant protein C (SP-C)*. Biochim. Biophys. Acta 1254 (1995), 326-332.
139. Possmayer, F.; *Biophysical activity of pulmonary surfactant*. Polin, R. A. und Fox, W. W.: Fetal and Neonatal Physiology. Bd. 90 Philadelphia: W. B. Sanders Co (1991), 459-962.
140. Harwood, J. L.; *Lung surfactant*. Progr. Lipid. Res. 26 (1987), 211-256.
141. Notter, R. H.; Shapiro, D. L.; Ohning, B.; Whitsett, J. A.; *Biophysical activity of synthetic phospholipids combined with purified lung surfactant 6000 dalton apoprotein*. Chem. Phys. Lipids 44 (1987), 1-17.
142. Revak, S. D.; Merritt, T. A.; Degryse, E.; Stefani, L.; Courtney, M.; Hallman, M.; Cochrane, C. G.; *Use of human surfactant low molecular weight apoproteins in the reconstitution of surfactant biologic activity*. J. Clin. Invest. 81 (1988), 826-833.
143. Whitsett, J. A.; Ohning, B. L.; Ross, G.; Meuth, J.; Weaver, T.; Holm, B. A.; Shapiro, D. L.; Notter, R. H.; *Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy*. Pediatric Res. 20 (1986), 460-467.
144. Egan, E. A.; Notter, R. H.; *Natural and artificial lung surfactant replacement therapy in premature lambs*. J. Appl. Physiol. 55 (1983), 875-883.

145. Kobayashi, T.; Nitta, K.; Takayashi, R.; Kurashima, K.; Robertson, B.; Suzuki, Y.; *Activity of pulmonary surfactant after blocking the associated proteins SP-A and SP-B*. J. Appl. Physiol. 71 (1991), 530-536.
146. Suzuki, Y.; Robertson, B.; Fujita, Y.; Grossmann, G.; Kogishi, K.; Curstedt, T.; *Lung protein leakage in respiratory failure induced by a hybridoma making monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant-associated polypeptide SP-B*. Int. J. Exp. Path. 73 (1992), 325-333.
147. Baatz, J. E.; Elledge, B.; Whitsett, J. A.; *Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers*. Biochem. 29 (1990), 6714-6720.
148. Cochrane, C. G.; Revak, S. D.; *Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships*. Science 254 (1991), 566-568.
149. Yu, S.H.; Possmayer, F.; *Effect of pulmonary surfactant protein B (SP-B) and calcium on phospholipid adsorption and squeeze-out of phosphatidylglycerol from binary phospholipid monolayers containing dipalmitoylphosphatidylcholine*. Biochim. Biophys. Acta 1126 (1992), 26-34.
150. Veldhuizen, R. A. W.; Inchley, K.; Hearn S. A.; Lewis, J. F.; Possmayer, F.; *Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates*. Biochem. J. 295 (1993), 141-147.
151. Tanaka, Y.; Takei, T.; Aiba, T.; Masuda, K.; Kiuchi, A.; Fujiwara, T.; *Development of synthetic lung surfactants*. J. Lipid. Res. 27 (1986), 475-485.
152. Takahashi, A.; Waring, A. J.; Amirkhanian, J.; Fan, B.; Taeusch, H. W.; *Structure-function relationships of bovine pulmonary surfactant proteins: SP-B and SP-C*. Biochim. Biophys. Acta 1044 (1990), 43-49.
153. Pastrana, B.; Mautone, A. J.; Mendelsohn, R.; *Fourier transform infrared studies of secondary structure and orientation of pulmonary surfactant SP-C and its effect on the dynamic surface properties of phospholipids*. Biochemistry 30 (1991), 10058-10064.
154. Bi, X.; Flach, C. R.; Perez-Gil, J.; Plasencia, I.; Andreu, D.; Olivera, E.; Mendelsohn, R.; *Secondary structure and lipid interactions of the N-terminal segment of pulmonary surfactant SP-C in Langmuir films: IR reflection-*

- absorption spectroscopy and surface pressure studies. Biochemistry* 41 (2002), 8385-8395.
155. King, R. J.; Martin, H. M.; *Effects of inhibiting protein synthesis on the secretion of surfactant by type II cells in primary culture. Biochim. Biophys. Acta* 663 (1981), 289-301.
 156. Revak, S. D.; Merritt, T. A.; Hallman, M.; Cochrane, C. E.; *Reconstitution of surfactant activity using purified human apoprotein and phospholipids measured in vitro and in vivo. Am. Rev. Respir. Dis.* 134 (1986), 1258-1265.
 157. Ross, G. F.; Notter, R. H.; Meuth, J.; Whitsett, J. A.; *Phospholipid binding and biophysical activity of pulmonary surfactant-associated protein (SAP)-35 and its non-collagenous COOH-terminal domains. J. Biol. Chem.* 261 (1986), 14283-14291.
 158. Venkitaraman, A. R.; Hall, S. B.; Whitsett, J. A.; Notter, R. H.; *Enhancement of biophysical activity of lung surfactant extracts and phospholipid-apoprotein mixtures by surfactant apoprotein A. Chem. Phys. Lipids* 56 (1990), 185-194.
 159. Kuroki, Y.; Mason, R. J.; Voelker, D. R.; *Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. J. Biol. Chem.* 263 (1988), 3388-3394.
 160. Wright, J. R.; Borchelt, J. D.; Hawgood, S.; *Lung surfactant apoprotein SP-A (26-36 kDa) binds with high affinity to isolated alveolar type II cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), 5410-5414.
 161. Ryan, R. M.; Morris, R. E.; Rice, W. R.; Ciraolo, G.; Whitsett, J. A.; *Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. J. Histochem. Cytochem.* 37 (1989), 429-440.
 162. Gortner, L.; Pohlandt, F.; Disse, B.; Weller, E.; *Effects of bovine surfactant in premature lambs after inta-tracheal application. Eur. J. Pediatr.* 149 (1990), 280-283.
 163. Couser, R. J.; Ferrara, T. B.; Ebert, J.; Hoekstra, R. E.; Fangman, J. J.; *Effects of exogenous surfactant therapy on dynamic compliance during mechanical breathing in preterm infants with hyaline membrane disease. J. Pediatr.* 116 (1990), 119-124.

164. Bhat, R.; Dziedzic, K.; Bhutani, V. K.; Vidyasagar, D.; *Effect of single dose surfactant on pulmonary function*. Crit. Care Med. 18 (1990), 590-595.
165. Petty, T. L.; Silvers, G. W.; Paul, G. W.; Stanford, R. E.; *Abnormalities in lung elastic properties and surfactant function in adult respiratory distress syndrome*. Chest 75 (1979), 571-574.
166. Kwong, M. S.; Egan, E. A.; Notter, R. H.; Shapiro, D. L.; *Double-blind clinical trial of calf lung surfactant extract for the prevention of hyaline membrane disease in extremely premature infants*. Pediatrics 76 (1985), 585-592.
167. Shapiro, D. L.; Notter, R. H.; Morin, F. C.; Deluga, K. S.; Golub, L. M.; Sinkin, R. A.; Weiss, K. I.; Cox, C.; *Double-blind, randomized trial of a calf lung surfactant extract administered at birth to very premature infants for prevention of respiratory distress syndrome*. Pediatrics 76 (1985), 593-599.
168. Bredenberg, C. E.; Paskanik, A. M.; Nieman, G. F.; *High surface tension pulmonary edema*. J. Surgical Res. 34 (1983), 515-523.
169. Nieman, G. F.; Bredenberg, C. E.; *High surface tension pulmonary edema induced by detergent aerosol*. J. Appl. Physiol. 58 (1985), 129-136.
170. Nieman, G. F.; Goyette, D.; Paskanik, A.; Bredenberg, C.; *Surfactant displacement by plasma lavage results in pulmonary edema*. Surgery 107 (1990), 677-683.
171. Jefferies, A. L.; Coates, G.; O'Broovich, H.; *Pulmonary epithelial permeability in hyaline-membrane disease*. N. Engl. J. Med. 311 (1984), 1075-1080.
172. Evander, E.; Wollmer, P.; Johnson, B.; Lachman, B.; *Pulmonary clearance of inhaled 99mTc-DTPA: effect of surfactant depletion by lung lavage*. J. Appl. Physiol. 62 (1987), 1611-1614.
173. Ikegami, M.; Jobe, A. H.; Tabor, B. L.; Rider, E. D.; Lewis, J. F.; *Lung albumin recovery in surfactant-treated preterm ventilated lambs*. Am. Rev. Respir. Dis. 145 (1992), 1005-1008.

174. Kaneko, T.; Saso, T.; Katsuya, H.; Miyauchi, Y.; *Surfactant therapy for pulmonary edema due to intratracheally injected bile acid*. Crit. Care Med. 18 (1990), 77-83.
175. Gehr, P.; Im Hof, V.; Geiser, M.; Schürch, S.; *The mucociliary system of the lung-role of surfactant*. Schweiz. Med. Wochenschr. 130 (2000), 691-698.
176. De Sanctis, G. T.; Tompiewicz, R. P.; Rubin, B. K.; Schürch, S.; King, M.; *Exogenous surfactant enhances mucociliary clearance in the anesthetized dog*. Eur. Respir. J. 7 (1994), 1616-1621.
177. Kakuta, Y.; Sakasi, H.; Takishima, T.; *Effect of artificial surfactant on ciliary beat frequency in guinea pig trachea*. Respir. Physiol. 83 (1991), 313-322.
178. Festa, E.; Saldiva, P. H. N.; King, M.; *Effects of bovine surfactant (bLES) on rheological properties and mucociliary transport of respiratory secretions in cystic fibrosis (CF) patients*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 151 (1995), A314.
179. Ikeda, K.; Sasaki, T.; Shimura, S.; Satoh, M.; Isihara, H.; Sasaki, H.; Takishima, T.; Saitoh, Y.; Nishiyama, A.; *Effect of surfactant on bioelectric properties of canine tracheal epithelium*. Respir. Physiol. 81 (1990), 41-49.
180. Gehr, P.; Green, F. H. Y.; Geiser, M.; Im Hof, V.; Lee, M. M.; Schürch, S.; *Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects*. J. Aerosol. Med. 9 (1996), 163-181.
181. Ahuja, A.; Oh, N.; Chao, W.; Spragg, R. G.; Smith, R. M.; *Inhibition of the human neutrophil respiratory burst by native and synthetic surfactant*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 14 (1996), 496-503.
182. Ghio, A. J.; Fracica, P. J.; Young, S. L.; Piantadosi, C. A.; *Synthetic surfactant scavenges oxidants and protects against hyperoxic lung injury*. J. Appl. Physiol. 77 (1994), 1217-1223.
183. Fracica, P. J.; Caminiti, S. P.; Piantadosi, C. A.; Duhaylongsod, F. G.; Crapo, J. D.; Young, S. L.; *Natural surfactant and hyperoxic lung injury in primates. 2. morphometric analysis*. J. Appl. Physiol. 76 (1994), 1002-1010.
184. Rüstow, B.; Haupt, R.; Stevens, P.; Kunze, D.; *Type II pneumocytes secrete vitamin E together with surfactant lipids*. Am. J. Physiol. 265 (1993), L133-L139.

185. Meyer, K. C.; Zimmermann, J. J.; *Inflammation and surfactant*. Paediatr. Respir. Rev. 3 (2002), 308-314.
186. Kishor, U.; Madan, T.; Sarma, P. U.; Singh, M.; Urban, B. C.; Reid, K. B.; *Protective roles of pulmonary surfactant proteins, SP-A and SP-D, against lung allergy and infection caused by Aspergillus fumigatus*. Immunobiology 205 (2002), 610-618.
187. Van Iwaarden, J. F.; Van Strijp, J. A.; Ebskamp, M. J.; Welmers, A. C.; Verhoef, J.; Van Golde, L. M.; *Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of Herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages*. Am. J. Physiol. 261 (1991), L204-L209.
188. Tenner, A. J.; Robinson, S. L.; Borchelt, J.; Wright, J. R.; *Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis*. J. Biol. Chem. 264 (1989), 13923-13928.
189. Van Iwaarden, F.; Welmers, B.; Verhoef, J.; Haagsman, H. P.; Van Golde, L. M. G.; *Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defence mechanism of rat alveolar macrophages*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2 (1990), 91-98.
190. Benne, C. A.; Kraaijeveld, C. A.; Van Strijp, J. A. G.; Brouwer, E.; Harmsen, M.; Verhoef, J.; Van Golde, L. M. G.; Van Iwaarden, J. F.; *Interaction of surfactant protein A with influenza viruses: binding and neutralization*. J. Infect. Dis. 171 (1995), 335-341.
191. Quintero, O. A.; Korfhagen, T. R.; Wright, J. R.; *Surfactant protein A regulates surfactant phospholipid clearance after LPS-induced injury in vivo*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 283 (2002), L76-L85.
192. Hawgood, S.; Ochs, M.; Jung, A.; Akijama, J.; Allen, L.; Brown, C.; Edmondson, J.; Levitt, S.; Carlson, E.; Gillespie, A. M.; Villar, A.; Epstein, C. J.; Poulain, F. R.; *Sequential targeted deficiency of SP-A and -D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 283 (2002), L1002-L1010.
193. Hutchison, A. A.; *Substrate mobilisation: a new hypothesis for the aetiology for the idiopathic respiratory distress syndrome*. Med. Hypotheses 2 (4) (1976), 168-173.

194. Patterson, C. E.; Rhoades, R. A.; *Substrate utilization in the perinatal lung*. Am. J. Physiol. 257 (1989), L 318-L330.
195. Schwartze, H.; *Recent findings in fetal lung development: structure, surfactant, lung fluid*. Zentralbl. Gynäkol. 112 (1990), 331-335.
196. Schwartz, R. M.; Luby, A. M.; Scanlon, J. W.; Kellogg, R. J.; *Effect of surfactant on morbidity, mortality and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500g*. New Engl. J. Med. 330 (1994), 1476-1480.
197. Liechty, E. A.; Donovan, E.; Purohit, D.; *Reduction of neonatal mortality after multiple doses of bovine surfactant in low birth weight neonates with respiratory distress syndrome*. Pediatrics 76 (1991), 19-21.
198. Jobe, A.; *Pulmonary surfactant therapy*. New Engl. J. Med. 328 (1993), 861-868.
199. Günther, A.; Ruppert, C.; Schmidt, R.; Markart, P.; Grimminger, F.; Walmrath, D.; Seeger, W.; *Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome*. Respir. Res. 2 (2001), 353-364.
200. Weg, J. G.; Balk, R. A.; Tharatt, R. S.; Jenkinson, S. G.; Shah, J. B.; Zaccardelli, D.; Horton, J.; Pattishall, E. N.; *Safety and potential efficacy of an aerolized surfactant in human sepsis-induced adult respiratory distress syndrome*. JAMA-J. Am. Med. Assoc. 272 (1994), 1433-1438.
201. Gregory, T. J.; Longmore, W. J.; Moxley, M. A.; Cai, G. Z.; Gadek, J. E.; Weiland, J. E.; Heyers, T. M.; Crim, C.; Hudson, L. D.; Steinberg, K. P.; Maunder, R. A.; Spragg, R. G.; Smith, R. M.; Tierney, D. F.; Gipe, B.; *Surfactant repletion following surfactant supplementation in patients with acute respiratory distress syndrome*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 149 (1994), A 124.
202. Walmrath, D. Günther, A.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R.; Schneider, T.; Grimminger, F.; Seeger, W.; *Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154 (1996), 57-62.
203. Foster, C. D.; Zhang, P. X.; Gonzales, L. W.; Guttentag, S. H.; *In vitro surfactant protein B (SP-B) deficiency inhibits lamellar body formation*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2003), .

204. Veldhuizen, R. A. W.; Hearn, S. A.; Lewis, J. F.; Possmayer, F.; *Surface-area cycling of different surfactant preparations: SP-A and SP-B are essential for large aggregate integrity*. *Biochem. J.* 300 (1994), 519-524.
205. Melton, K. R.; Nessler, L. L.; Ikegami, M.; Tichelaar, J. W.; Clark, J. C.; Whitsett, J. A.; Weaver, T. E.; *SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* (2003),.
206. Haczku, A.; Atochina, E. N.; Tomer, Y.; Cao, Y.; Campbell, C.; Scanlon, S. T.; Russo, S. J.; Enhorning, G.; Beers, M. F.; *The late asthmatic response is linked with increased surface tension and reduced surfactant protein B in mice*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283 (2002), L755-L765.
207. Weaver, T. E.; Conkright, J. J.; *Function of surfactant proteins B and C*. *Annu. Rev. Physiol.* 63 (2001), 555-578.
208. Ikegami, M.; Weaver, T. E.; Conkright, J. J.; Sly, P. D.; Roff, G. F.; Whitsett, J. A.; Glasser, S. W.; *Deficiency of SP-B reveals protective role of SP-C during oxygen lung injury*. *J. Appl. Physiol.* 92 (2002), 519-526.
209. Bridges, J. P.; Davis, H. W.; Damodarasamy, M.; Kuroki, Y.; Howles, G.; Hui, D. Y.; McCormack, F.; *Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury*. *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 38848-38855.
210. Thomas, A. Q.; Lane, K.; Phillips, J.; III; Prince, M.; Markin, C.; Speer, M.; Schwartz, D. A.; Gaddipati, R.; Marney, A.; Johnson, J.; Roberts, R.; Haines, J.; Stahlman, M.; Loyd, J. E.; *Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred*. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 165 (2002), 1322-1328.
211. Amin, R. S.; Wert, S. E.; Baughman, R. P.; Tomashefski, J. F. Jr.; Noguee, L. M.; Brody, A. S.; Hull, W. M.; Whitsett, J. A.; *Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease*. *J. Pediatr.* 139 (2001), 85-92.
212. Günther, A.; Schmidt, R.; Nix, F.; Yabut-Perez, M.; Guth, C.; Rousseau, S.; Siebert, C.; Grimminger, F.; Morr, H.; Velcovsky, H. G.; Seeger, W.; *Surfactant*

abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. Eur. Resp. J. 14 (1999), 565-573.

213. Huang, Y. C.; Sane, A. C.; Simonson, S. G.; Fawcett, T. A.; Moon, R. E.; Fracica, P. J.; Menache, M. G.; Piantadosi, C. A.; Young, S. L.; *Artificial surfactant attenuates hyperoxic lung injury in primates. I. Physiology and Biochemistry. J. Appl. Physiol. 78 (1995), 1816-1822.*
214. Piantadosi, C. A.; Fracica, P. J.; Duhaylongsod, F. G.; Huang, Y. C.; Welty-Wolf, K. E.; Crapo, J. D.; Young, S. L.; *Artificial surfactant attenuates hyperoxic lung injury in primates. II. Morphometric analysis. J. Appl. Physiol. 78 (1995), 1823-1831.*
215. Sachs, S.; Ghio, A. J.; Young, S. L.; *Tyloxapol confers durable protection against hyperoxic lung injury in the rat. Exp. Lung Res. 25 (1999), 543-559.*
216. Ueda, T.; Ikegami, M.; Jobe, A. H.; *Developmental changes of sheep surfactant: in vivo function and in vitro subtype conversion. Am. Physiol. Soc. (1994), 2701-2706.*
217. Lewis, J. F.; Veldhuizen, R.; Possmayer, F.; Sibbald, W.; Whitsett, J.; Qanbar, R.; McCaig, L.; *Altered alveolar surfactant is an early marker of acute lung injury in septic sheep. Am. J. Resp. Crit. Care med. 150 (1994), 123-130.*
218. Veldhuizen, R. A. W.; McCaig, L. A.; Akino, T.; Lewis, J. F.; *Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152 (1995), 1867-1871.*
219. Günther, A.; Schmidt, R.; Feustel, A.; Meier, U.; Pucker, C.; Ermert, M.; Seeger, W.; *Surfactant subtype conversion is related to loss of surfactant apoprotein B and surface activity in large surfactant aggregates. Am. J. Respir. Crit. Care M 159 (1999), 244-251.*
220. Gross, N. J.; Schultz, R.; *Serine protease requirement for the extra-cellular metabolism of pulmonary surfactant. Biochim. Biophys. Acta 1044 (1990), 222-230.*

221. Gross, N.; Schultz, R. M.; *Requirements for extracellular metabolism of pulmonary surfactant: tentative identification of serine protease*. Am. J. Physiol. 262 (1991), L446-L453.
222. Krishnasamy, S.; Gross, N. J.; Teng, A. L.; Schulz, R. M.; Dhand, R.; *Lung "surfactant convertase" is a member of the carboxylesterase family*. Biochem. and Biophys. Res. Com. 235 (1997), 180-184.
223. Krishnasamy, S.; Teng, A. L.; Dhand, R.; Schultz, R. M.; Gross, N. J.; *Molecular cloning, characterization, and differential expression pattern of mouse lung surfactant convertase*. Am. J. Physiol. 275 (1998), L969-L975.
224. Barr, F.; Clark, H.; Hawgood, S.; *Identification of a putative surfactant convertase in rat lung as a secret serine carboxylesterase*. Am. Physiol. Soc. (1998), L404-L410.
225. Oulton, M.; Edwards, E.; Handa, K.; *Convertase activity in alveolar surfactant and lamellar bodies in fetal, newborn, and adult rabbits*. J. Appl. Physiol. 86 (1999), 71-77.
226. Ruppert, C.; Pucker, C.; Markart, P.; Schmidt, R.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Stürzebecher, J.; Günther, A.; *Selective Inhibition of large-to-small surfactant aggregate conversion by serine protease inhibitors of the bis-benzamidine type*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 28 (2003), 95-102.
227. Daee, L. N. W.; Bremer, J.; *The acylation of glycerophosphate in rat liver. A new assay procedure for glycerophosphate acylation, studies on its subcellular and submitochondrial localisation and determination of the reaction products*. Biochim. Biophys. Acta 210 (1970), 92-104.
228. Bjerve, K. S.; Daee, L. N.W.; Bremer, J.; *The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures*. Anal. Biochem. 58 (1974), 238-245.
229. Christiansen, K.; *Lipid extraction procedure for in vitro studies of glyceride synthesis with labeled fatty acids*. Anal. Biochem. 66 (1975), 93-99.
230. Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G. H.; *A simple Method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J. Biol. Chem. 226 (1957), 497-509.

231. Bligh, E. G.; Dyer, W. J.; *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canad. J. Biochem. 37 (1959), 911-917.
232. Kolarovic, L.; Fournier, N. C.; *A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources*. Anal. Biochem. 156 (1986), 244-250.
233. Rouser, G.; Fleischer, S.; Yamamoto, A.; *Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. Lipids 5 (1970), 494-496.
234. Bartlett, G. R.; *Phosphorus assay in column chromatography*. J. Biol. Chem. 234 (1959), 466-468.
235. Wintersteiger, R.; Wenniger-Weinzierl, G.; *Neues, empfindliches Verfahren zur dünnschicht-chromatographischen Analyse von Substanzen mit alkoholischer Hydroxylgruppe durch Reaktion mit Naphtylisocyanat*. Fresenius Z. Anal. Chem. 309 (1981), 201-208.
236. Hallermeier, G.; Neupert, W.; *Lipid composition of mitochondrial outer and inner membranes of neurospora crassa*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355 (1974), 279-288.
237. Kuroki, Y.; Akino, T.; *Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine*. J. Bio. Chem. 266 (1991), 3068-3073.
238. Fornstedt, N.; Porath, J.; *Characterization studies on a new lectin found in seeds of vicia ervilia*. FEBS Lett. 57 (1975), 187-191.
239. Sigrist, H.; Sigrist-Nelson, K.; Gitler, C.; *Single-phase butanol extraction: A new tool for proteolipid isolation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 (1977), 178-184.
240. Tomono, T.; Ikeda, H.; Tokunaga, E.; *High-performance ion-exchange chromatography of plasma proteins*. J. Chromatogr. 266 (1983), 39-47.
241. Clezardin, P.; McGregor, J. L.; Manach, M.; Boukerche, H.; Dechavanne, M.; *One-step procedure for the rapid isolation of mouse monoclonal antibodies and*

- their antigen binding fragments by fast protein liquid chromatography on a mono Q anion-exchange column. J. Chromatogr. 319 (1985), 67-77.*
242. Mansson, J. E.; Rosengren, B.; Svennerholm, L.; *Separation of gangliosides by anion-exchange chromatography on mono Q. J. Chromatogr. 322 (1985), 465-472.*
243. Orr, G. A.; Blanchard, J. S.; *High-performance ion-exchange separation of oxidized and reduced nicotinemid adenine dinucleotides. Anal. Biochem. 142 (1984), 232-234.*
244. Stanton, P. G.; Simpson, R. J.; Lambrou, F.; Hearn, M. T.; *High-performance liquid chromatography of amino-acids, peptides and proteins. XLVII. Analytical and semi-preparative separation of several pituitary proteins by high-performance ion-exchange chromatography. J. Chromatogr. 266 (1983), 273-279.*
245. Warr, R. G.; Hawgood, S.; Buckley, D. I.; Crisp, T. M.; Schilling, J.; Benson, B. J.; Ballard, P. L.; Clements, J. A.; White, R. T.; *Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP5): isolation, characterization, and cDNA and amino acid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7915-7519.*
246. Bünger, H.; Kaufner, L.; Pison, U.; *Quantitative analysis of hydrophobic surfactant proteins by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. J. Chromatography A 870 (2000), 363-369.*
247. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C.; *Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150 (1985), 76-85.*
248. Wiechermann, K.; Braun, R.; Fitzpatrick, J.; *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for colour formation. Anal. Biochem. 175 (1988), 231-237.*
249. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951), 265-275.*
250. Peterson, G. L.; *Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal. Biochem. 100 (1979), 201-220.*

251. Sorensen, K.; Brodbeck, U.; *A sensitive protein assay method using micro-titer plates*. *Experientia* 42 (1986), 161-162.
252. Bradford, M. M.; *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding*. *Anal. Biochem.* 72 (1976), 248-254.
253. Pierce, J.; Suelter, C. H.; *An evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination*. *Anal. Biochem.* 81 (1977), 478-480.
254. Nave, R.; Fa. Byk Gulden, Konstanz; *Persönliche Mitteilung*. (1993).
255. Schägger, H.; Jagow, G. v.; *Tricine-sodium-doecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. *Anal. Biochem.* 166 (1987), 368-379.
256. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J.; *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979), 4350-4354.
257. Gustasson, M.; Curstedt, T.; Jörnvall, H.; Johansson, J.; *Reverse-phase HPLC of the hydrophobic surfactant proteins: detection of a surfactant protein C isoform containing N^ε-palmitoyl-lysine*. *Biochem. J.* 326 (1997), 799-806.
258. Dhand, R.; Sharma, V. K.; Teng, A. L.; Krishnasamy, S.; Gross, N. J.; *Protein-lipid interactions and enzyme requirements for light subtype generation on cycling reconstituted surfactant*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (1998), 712-719.
259. Dhand, R.; Young, J.; Teng, A.; Krishnasamy, S.; Gross, N. J.; *Is dipalmitoylphosphatidylcholine a substrate for convertase?* *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Biol. Physiol.* 278 (2000), L19-L24.
260. Schmidt, R.; Meier, U.; Markart, P.; Grimminger, F.; Velcovsky, H. G.; Morr, H.; Seeger, W.; Günther, A.; *Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Biol. Physiol.* 283 (2002), L1079-L1085.

261. Inchley, K.; Cockshutt, A.; Veldhuizen, R.; Possmayer, F.; *Dissociation of surfactant protein B from canine surfactant large aggregates during formation of small surfactant aggregates by in vitro surface area cycling*. Biochim Biophys. Acta 1440 (1999), 49-58.

8. Abkürzungen

A	Absorption
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
Area	Integratorfläche
AS	Aminosäure
AU	Absorptionseinheiten
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Phosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FS	Fettsäure
γ	Oberflächenspannung
IRDS	Infant Respiratory Distress Syndrome
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilo-Dalton
LSA	Large Surfactant Aggregates
MBP	Mannosebindendes Protein
MeOH	Methanol
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffer saline
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
pNPA	p-Nitrophenolacetat
RT	Raumtemperatur
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
SSA	Small Surfactant Aggregates

Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Professor Dr. Werner Seeger nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern vielmehr für die Eröffnung großer Entfaltungsmöglichkeiten, das stets offene Interesse und die konstruktive Kritik.

Mein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Günther, dessen Energie und Begeisterungsfähigkeit sich durch viele seiner Anregungen in dieser Arbeit niederschlug.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Reinhold Schmidt und Herrn Dr. Clemens Ruppert für die sehr große Hilfsbereitschaft, vielen Anregungen und die Unterstützung.

Ganz herzlich danke ich Frau Christina Daum, Frau Silke Händel, Frau Karin Fietzner und Frau Kathrin Petri für die Mithilfe bei der Analytik und für die sehr angenehme Atmosphäre, sowie allen nicht genannten Mitarbeitern im Umkreis der "Surfactants".

Meine tiefste Dankbarkeit gehört jedoch meinen Eltern, die mich mein Leben lang gefördert haben. Sie haben mir dadurch all dies und noch viel mehr ermöglicht.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Dresden, den 06.10.05

A. Bagheri

Lebenslauf

Persönliche Daten:

61 Name: Bagheri
62 Vorname: Ariane
Geburtsdatum: 04.01.1970
Geburtsort: Meppen
Anschrift: Pfotenhauer Str.112
01307 Dresden
0351 / 374 58 13
Familienstand: ledig



Schulbildung:

1975-1980 Grundschulen in Münster, Bühl und Pirmasens
1980-1989 Hugo-Ball-Gymnasium Pirmasens
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1989-1993 RWTH Aachen: Grundstudium Chemie/Diplom
1993-1996 Humboldt-Universität zu Berlin: Hauptstudium
Chemie/Diplom
Abschluß: Diplom-Chemikerin
1997-2002 Justus-Liebig-Universität Gießen:
Studium der Humanmedizin
22.10.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

berufliche Laufbahn:

01.12.02-31.05.03 Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik II
des Universitätsklinikums Gießen
01.06.03-31.05.04 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie und
Intensivtherapie des Universitätsklinikums Dresden
Seit 01.06.04 Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Anästhesiologie
und Intensivtherapie des Universitätsklinikums Carl-
Gustav-Carus Dresden

A. Bagheri